

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE
L'INFLUENCE DES ÊTRES VIVANTS
SUR LA CONSERVATION
DES EAUX SULFUREUSES

THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte de Médecine Générale
et Tropicale et de Pharmacie de Marseille
Le 4 Juillet 1950

par

Jacques HERVÉ

Pharmacien

Diplômé de l'Institut de Pharmacie Industrielle de Paris

POUR OBTENIR LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (Mention Pharmacie)

Examineurs de la Thèse	{	MM. RIMATTEI, Président	{	Assesseurs
		BALANSARD, Professeur		
		DERRIEN »		
		MOURGUES, Maître de Conférences		



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549018_0067

FACULTÉ MIXTE DE
MEDECINE GENERALE ET TROPICALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE
L'INFLUENCE DES ÊTRES VIVANTS
SUR LA CONSERVATION
DES EAUX SULFUREUSES

THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte de Médecine Générale
et Tropicale et de Pharmacie de Marseille
Le 4 Juillet 1950

par

Jacques HERVÉ

Pharmacien

Diplômé de l'Institut de Pharmacie Industrielle de Paris

POUR OBTENIR LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (Mention Pharmacie)

Examineurs de la Thèse	{	MM. RIMATTEI, Président	{	Assesseurs
		BALANSARD, Professeur		
		DERRIEN »		
		MOURGUES, Maître de Conférences		

Personnel Enseignant de la Faculté Mixte de Médecine Générale et Tropicale et de Pharmacie de Marseille

Doyen : L. CORNIL

Assesseur : J. MORIN

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MM. GAUJOUX, AUBARET, AUDIBERT,
JOYEUX, OLMER, ROCHE, GABRIEL.

Chargé de cours honoraire : M. TIAN

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : Mlle FERRIN

Professeurs :

Anatomie	N...
Anatomie Pathologique et Calcinologie clinique	MM. CORNIL.
Bactériologie et Pathologie Générale	POURSINES.
Chimie Analytique et Hydrologie	RIMATTEI.
Chimie Médicale	DERRIEN.
Clinique Chirurgicale	FIOLLE.
Clinique Chirurgicale	MOIROUD.
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédie	SALMON.
Clinique Chirurgicale Thérapeutique et Chirurgie Expérimentale	DE VERNEJOL.
Clinique Exotique	HECKENROTH.
Clinique des maladies nerveuses	ROGER.
Clinique Médicale	MATTEI.
Clinique Médicale	POINSE.
Clinique Médicale et Thérapeutique	J. OLMER.
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD.
Clinique des Maladies des voies digestives et de la nutrition	MONGES.
Clinique Obstétricale et Gynécologique	VAYSSIÈRE.
Clinique Ophtalmologique	JAYLE.
Clinique Oto-rhino-laryngologique et Maxillo-faciale	BREMOND.
Clinique Urologique	CHAUVIN.
Histoire Naturelle	BALANSARD.
Histologie	ROMIEU.
Hygiène Générale et Coloniale	VIOLLE.
Médecine légale	MOSINGER.
Parasitologie	SAUTET.
Pathologie Chirurgicale	CARCASSONNE.
Pharmacodynamie et Matière Médicale	M. J. MERCIER.
Pharmacie Chimique et Toxicologie	VIGNOLI.
Pharmacie Galénique	DELPHAUT.
Physiologie	MORIN.
Physique	DUBOULOZ.
Stomatologie	BELTRAMI.
Professeurs sans chaire	ARNOUX.
	PIERI.

Chargé de Cours :

Clinique Dermatologique CHARPY

Agrégés libres :

MM. AUDIER, BRAHIC, BERTHIER, CHOSSON, DOR, FIGARELLA, IMBERT,
PAILLAS, RECORDIER.

Agrégés en Exercice :

MM. BERNARD, GRANJON, GRISOLI, HENRY, JOUVE, LAMY, LAVAL,
LENA, MONGES Henri, OURGAUD, PAOLI, RAYBAUD, VAGUE.

Maîtres de Conférences :

MM. ARNOUX, DONNET, DUMAZERT, GASTAUD, MOURGUE, OLLIVIER,
PELLISIER, PICARD, RANQUE, ROUX.

Chargé des Fonctions d'Agrégé :

Pharmacodynamie et Matière Médicale : M. J. MERCIER.



A MON PERE

A MA MERE

*Seul mon amour filial, peut leur
exprimer toute ma reconnaissance.*

A MON FRERE

A MON MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE DOCTEUR F. RIMATTEI

Professeur de Chimie Analytique et Hydrologie

Chevalier de la Légion d'Honneur

Avec une grande bienveillance il nous a accueilli dans son laboratoire de la Faculté où il a mis à notre disposition ses techniques Physico-chimiques personnelles. Sans jamais se lasser, il nous a prodigué pendant plus de deux ans ses précieux conseils pour l'élaboration et la rédaction de notre Thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude.

A MON JURY DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR BALANSARD

MONSIEUR LE PROFESSEUR DERRIEN

MONSIEUR MOURGUES, MAITRE DE CONFERENCES

*En hommage de ma gratitude pour la
bienveillante attention qu'ils ont bien
voulu témoigner à ce travail.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. R. PREVOT
Chef de travaux à l'Institut Pasteur de Paris

A MADAME HELENE WINOGRADSKY
Assistante à l'Institut Pasteur de Paris

*Qui ont bien voulu s'intéresser à nos
recherches et nous apporter leur bien-
veillante et précieuse collaboration.*

A MONSIEUR JACQUES DE LA LOMBARDIERE DE CANSON
Chevalier de la Légion d'Honneur

A MONSIEUR JEAN DEDIEU

Pour la confiance qu'ils nous ont toujours témoignée et leur amicale sollicitude à notre égard.

A TOUS NOS AMIS

Introduction

Le soufre est un des constituants essentiels du protoplasma, il entre dans la constitution de composés dont la fonction nous apparaît actuellement primordiale, les uns synthétisés par notre corps comme le glutathion, l'héparine, l'insuline, les autres introduits tout formés dans l'organisme : la biotine, la vitamine B¹.

Dans ces corps, le soufre ne semble pas avoir seulement un rôle plastique comme le carbone, l'hydrogène et l'azote, mais il intervient plutôt comme élément aux fonctions multiples.

Le Professeur Looper ⁽¹⁾ et ses élèves ont montré l'importance du métabolisme du soufre au point de vue normal et pathologique. Une médication soufrée judicieuse permet souvent de modifier ce métabolisme ; le soufre par ses propriétés remarquables de réversibilité chimique apparaît comme « un régulateur, un balancier attentif au maintien de l'équilibre élémentaire de la molécule vivante ». (Professeur Loeper).

L'utilisation du soufre sous la forme d'eaux sulfureuses dans un but thérapeutique remonte à l'antiquité et la grande activité de ces Eaux leur a fait réserver une place spéciale dans la thérapeutique.

Nous avons été amené à nous occuper tout spécialement de l'eau sulfureuse d'Uriage connue depuis très longtemps comme en témoigne la mise à jour des thermes que les Romains y avaient construits. Le début de l'exploitation moderne remonte à 1820 et l'établissement qui fut construit à cette époque comportait des installations de bains et douches et une salle d'inhalations et de pulvérisations. Peu à peu ces installations s'amplifièrent mais ce n'est qu'à partir de 1920 qu'une méthode de traitement tout à fait originale fut instituée à Uriage : l'introduction directe d'eau sulfureuse dans l'organisme par voie parentérale.

Ce mode d'administration n'a été possible que grâce à plusieurs propriétés remarquables de l'eau d'Uriage :

 Sa sulfuration ni trop forte, ni trop faible ; sa pureté bactéri-

logique ; et surtout son isotonie avec le sérum sanguin.

C'est ce qui a été publié par Larat ⁽²⁾ dans le bulletin de l'Académie de Médecine. D'après cet auteur, cette isotonie est démontrée :

1°) Par une certaine ressemblance dans la composition et par la concentration moléculaire des deux liquides traduites par les valeurs voisines des points cryoscopiques respectifs.

$$\Delta t \text{ (sérum sanguin)} = - 0,56.$$

$$\Delta t \text{ (eau d'Uriage)} = - 0,58.$$

2°) Par la signification de l'expérience suivante destinée à démontrer *in vitro* ce que l'étude physico-chimique laissait prévoir ; en effet une solution ayant la même concentration et un même abaissement du point de congélation que le sérum sanguin peut cependant hémolyser les globules rouges au moins partiellement.

Prenant des tubes à essais remplis d'eau minérale des différentes stations thermales : Enghien, Uriage, Eaux-Bonnes, Vichy, Royat, La Bourboule ; Larat y ajoute une goutte de sang et après un séjour d'une heure à l'étuve à 37°, il centrifuge le contenu de ces tubes. Seul le liquide surnageant le culot de centrifugation du tube contenant l'eau d'Uriage est incolore. Dans les autres l'hémolyse est soit partielle (eau de la Bourboule dont le point cryoscopique est aussi très voisin de celui du sérum sanguin), soit totale. Ces expériences réalisées « *in vitro* » nous conduisent à la notion d'isotonie physiologique d'un liquide par rapport au sérum sanguin, c'est-à-dire la propriété d'un liquide qui au point de vue physico-chimique peut être introduit dans le sang en quantité assez importante, 10, 20 et même 100 cc sans provoquer de phénomène de choc.

L'isotonie physiologique de l'eau d'Uriage pressentie à la suite de l'expérience de Larat a été démontrée par la pratique des injections de cette eau aux malades. En effet, à la suite des travaux de Quinton ⁽³⁾ exposés dans son ouvrage « L'eau de mer milieu organique », des essais d'injection d'eau minérale naturelle avaient été tentés mais c'est à Fleig de Montpellier que sont dues les premières injections d'eau sulfureuse et d'eau d'Uriage en particulier. L'isotonie parfaite de l'eau d'Uriage permet précisément de poursuivre les essais de ce mode d'administration : les injections étant, de ce fait, indolores et facilement résorbées même pour de grandes quantités de liquide.

A la suite des travaux de Larat en 1923, cette thérapeutique

est non seulement devenue courante, mais c'est la base du traitement pratiqué à Uriage par les médecins de la station. De nombreuses publications et communications ont été consacrées à cette thérapeutique et les attestations recueillies dans les hôpitaux témoignent des résultats fort intéressants obtenus.

L'utilisation de l'eau d'Uriage par voie parentérale n'a été possible qu'en raison de sa grande pureté. Bien que l'étude bactériologique de cette eau fasse précisément l'objet d'une partie de ce travail, nous pouvons dès à présent signaler que jamais il n'a été trouvé de microbes pathogènes dans les analyses successives.

C'est ce qui explique que depuis près de 25 ans les médecins de la station ont pu faire des milliers d'injections avec l'eau telle qu'elle coule au robinet de la buvette sans qu'aucun accident ait été signalé et cela avec des résultats thérapeutiques apparemment supérieurs à ceux fournis par les anciennes méthodes crénothérapiques, (bains, douches, etc...) on comprend alors l'intérêt d'une généralisation de cette thérapeutique en l'étendant aux malades qui ne peuvent venir à la station ; mais pour cela il faut pouvoir réaliser un mode convenable de conservation de l'eau minérale.

La conservation de l'eau en bouteilles est difficile à réaliser sur une grande échelle dans des conditions d'aseptie rigoureuse, c'est pourquoi depuis quelques années on a songé à mettre l'eau d'Uriage en ampoules.

Cette forme pharmaceutique offre en effet plusieurs avantages : c'est la forme habituellement utilisée pour les médicaments injectables et elle est tout à fait entrée dans les habitudes du public ; la fermeture du récipient par soudure est la plus parfaite ; le liquide injecté est à l'abri des souillures que peuvent apporter des prélèvements répétés dans le même flacon, chaque ampoule ouverte étant rejetée après l'injection ; le contrôle de la fermeture des ampoules est plus facile à réaliser que celui des flacons.

Toutefois ce n'est pas sans difficultés qu'on peut réaliser de manière convenable la conservation en ampoules de l'eau d'Uriage. Nous avons pensé qu'une technique sûre devait être cherchée dans le comportement physico-chimique et bactériologique de cette eau minérale conservée en ampoules scellées à la lampe.

Au point de vue physico-chimique les travaux exécutés au Laboratoire d'Hydrologie de la Faculté de Médecine de Marseille par le Professeur RIMATTEI et son élève Jean PETIT, à propos de l'évolution de l'eau des Camoins-les-Bains, nous a fourni une base de départ intéressante,

Nous décrivons donc brièvement les importantes expériences réalisées par MM. Rimattei et Petit et nous en retenons les conclusions utilisables pour notre travail. D'abord la définition empirique de l'état physico-chimique d'une eau sulfureuse et comme conséquence, la possibilité d'un repérage physico-chimique de l'évolution de cette eau ; c'est-à-dire la détermination en fonction du temps de l'influence des différents agents d'altération : chaleur, lumière, oxygène de l'air, etc..., sur les propriétés de l'eau sulfureuse conservée en ampoules scellées à la lampe ou dans des bouteilles remplies dans des conditions déterminées.

Nous rappelons aussi les faits connus concernant l'action des êtres vivants sur l'évolution des eaux sulfureuses et les constatations faites par MM. Rimattei et Petit sur l'eau sulfurée calcique des Camoins-les-Bains (Marseille) et nos premières observations sur l'eau sulfurée d'Uriage contenue dans nos ampoules scellées à la lampe (apparition et disparition de globules de soufre dans l'eau limpide).

Nous développons ensuite l'exposé de nos travaux personnels ayant pour but la recherche d'une relation entre les facteurs physico-chimiques et les facteurs biologiques de l'évolution des eaux sulfureuses et enfin l'application de ces travaux à la réalisation d'un procédé de mise en ampoules de l'eau sulfureuse d'Uriage assurant une bonne conservation de cette eau.

Nos recherches comportent :

Une étude physico-chimique particulière de l'eau sulfureuse d'Uriage conservée en ampoules de verre scellées à la lampe, étude qui prolonge et complète celle entreprise en 1938 par MM. Rimattei et Petit sur l'eau des Camoins-les-Bains ; nous décrivons au cours de cette étude physico-chimique les méthodes et les appareils qui ont été utilisés soit au laboratoire d'Uriage soit dans celui du professeur Rimattei à la Faculté de Médecine de Marseille sous la direction de qui nous avons travaillé en collaboration avec M. J. Pastor.

Une étude récente sur la biologie des eaux d'Uriage, due au professeur Morel de la Faculté de Médecine de Lyon pour la bactériologie générale ; à M. le Professeur Prévot et à Mme Winoogradsky de l'Institut Pasteur de Paris pour la bactériologie spéciale de notre eau sulfureuse (microbes oxydants et réducteurs des composés sulfurés).

Nos conclusions tirées du rapprochement des résultats des études physico-chimiques et biologiques relatives au vieillissement de

l'eau d'Uriage conservée en ampoules scellées à la lampe.

L'application de nos recherches théoriques, c'est-à-dire la description des dispositifs réalisés par nous afin d'assurer à l'échelle industrielle une mise en ampoules garantissant une bonne conservation de l'eau d'Uriage et permettant son emploi efficace loin de la source.

Notre Conclusion Générale

Pour terminer nous remercions vivement tous ceux qui nous ont aidé dans nos recherches.

Notre Maître et Président de thèse, Monsieur le Professeur RIMATTEI, qui nous a témoigné sa sollicitude en dirigeant nos efforts et en mettant à notre disposition, avec son laboratoire, les méthodes physico-chimiques originales de repérage de l'évolution des eaux minérales mises au point dans ce laboratoire. Nous le remercions de l'accueil bienveillant que nous avons toujours trouvé auprès de lui.

Monsieur le Professeur PRÉVOT et Madame WINOGRADSKY, de l'Institut Pasteur de Paris qui ont bien voulu entreprendre des recherches particulières sur la biologie de l'eau sulfureuse d'Uriage.

Monsieur le Professeur MOREL, sous-directeur de l'Institut Bactériologique de Lyon, qui nous a permis d'utiliser les résultats de l'expertise qu'il a été amené à faire à Uriage.

Monsieur Jean PASTOR, assistant au Laboratoire d'Hydrologie qui nous a consacré le temps nécessaire à nos mesures physiques.

CHAPITRE I

Étude Théorique

1°) *TRAVAUX INTERIEURS RELATIFS A L'EVOLUTION DES EAUX SULFUREUSES CONSERVEES EN AMPOULES SCHELLES A LA LAMPE.* (Travaux de MM. RIMATTEI et PETIT).

En 1938 le Professeur RIMATTEI et son élève J. PETIT se sont proposés un objet de recherches analogues à celles que nous poursuivrons : la détermination des conditions à réaliser pour la conservation des eaux sulfureuses en vue de leur utilisation loin des griffons. ⁽⁴⁾

Ils ont pour cela choisi un certain nombre de tests pour pouvoir repérer l'évolution d'une eau sulfureuse, ces tests se rapportent aux propriétés physico-chimiques auxquelles on attribue généralement la valeur thérapeutique de l'eau étudiée.

Nous résumerons rapidement les travaux de MM. RIMATTEI et PETIT car ils ont montré d'une part que des facteurs ayant en apparence une certaine importance n'en avait en réalité aucune ; d'autre part, ils ont étudié scientifiquement l'influence de l'oxygène de l'air sur les eaux sulfureuses, principale cause de l'altération de ces eaux. Ils ont en outre soupçonné l'influence des êtres vivants ce qui fait principalement l'objet de nos recherches.

A) Définition et rappel succinct de la méthode de mesure des grandeurs suivantes :

- a) Sulfuration
- b) Alcalinité
- c) Conductivité électrique
- d) pH, pouvoir tampon
- e) Indice de nutrition ordinaire et simplifié.

Il importe tout d'abord de préciser les techniques qui ont été utilisées par MM. RIMATTEI et PETIT lors de leurs recherches sur l'eau des Camoins-les-Bains ; dispositifs et méthodes dont certains ont été utilisés par nous et à propos desquels nous ne reviendrons pas dans notre étude expérimentale.

a) *Sulfuration* :

Elle exprime le pouvoir réducteur d'une eau sulfureuse vis-à-vis d'une solution d'iode dans l'iodure de potassium. On peut donner les résultats de différentes manières pour MM. RIMATTEI et PETIT elle correspond au nombre de cm^3 d'iode N/10 nécessaires pour oxyder 1 litre d'eau minérale.

b) *Alcalinité* :

Elle s'exprime en cm^3 de solution acide titrée nécessaire pour neutraliser 1 litre d'eau minérale, en présence phthaleïne du phénol comme indicateur coloré.

c) *Conductivité électrique* :

Nous rappelons la définition de la conductivité électrique : Soit un cylindre de longueur L et de base $S \text{ cm}^2$ intercalé dans un circuit électrique, R la valeur de la résistance électrique de ce cylindre, on appelle conductivité électrique la grandeur γ définie par la relation :

$$\text{Rohms} = \frac{1}{\gamma} \frac{1 \text{ cm}}{S \text{ cm}^2}$$

γ est exprimé en une unité spéciale le mho $\text{cm} - \text{cm}^2$ le rapport $\frac{1 \text{ cm}}{S \text{ cm}^2}$ dépend uniquement de la cuve, c'est sa constante (déterminée par expérience) ; on obtient R , au moyen d'un ohmmètre, cette mesure se fait classiquement à l'aide du pont de Kohlrausch, MM. RIMATTEI et PETIT ont perfectionné l'appareil utilisé de façon à rendre la mesure plus sensible. Connaissant la constante de la cuve et R , on en déduit la conductivité cherchée.

Les mesures de conductivité ont, non seulement été faites sur l'eau sulfureuse pure, mais aussi sur l'eau diluée par l'eau pure, ce qui a pour effet, en faisant varier l'ionisation, de mettre en lumière des différences ou des ressemblances dans la constitution des eaux étudiées.

d) *pH pouvoir tampon* :

Le pH c'est le cologarithme de la concentration en ions hydrogène d'une solution ; MM. RIMATTEI et PETIT ont utilisé la méthode colorimétrique et la méthode électrique : aux griffons à l'aide de colorants et de disques colorimétriques de la Maison HELIGE ; au laboratoire d'hydrologie de la Faculté de Médecine de Marseille, à l'aide de la méthode électrique au moyen d'un potentio-pHmètre. Parallèlement à l'étude du pH les auteurs ont tracé les courbes de neutralisation de l'eau des Camoins, c'est-à-dire la courbe repré-

sentant la variation continue du pH en fonction de l'addition de quantités croissantes de solution acide. L'allure de la courbe permet de se faire une idée du pouvoir tampon ; l'aire comprise entre la courbe de variation du pH et la droite d'ordonnée correspondant à pH 7, représente d'après CAUJOLLE ⁽⁵⁾ « la puissance alcaline de cette eau » qui permettrait de caractériser chaque eau sulfureuse.

e) *Indice de nutrition :*

SCOUTETTEN, en 1864, publiait un article intitulé « De l'électricité considérée comme principe de l'action des eaux minérales sur l'organisme » il établissait une relation entre la valeur thérapeutique d'une eau minérale et la déviation qu'elle faisait subir dans certaines conditions à l'aiguille d'un galvanomètre.

Monsieur J.-L. PÉCH a repris cette notion et lui a donné le nom d'indice de nutrition ⁽⁶⁾. Voici comment il le détermine. Il plonge un doigt dans l'eau minérale et un autre doigt dans une solution de ClNa à 9 pour mille, dans chaque liquide plonge également un fil de platine ; ces deux fils étant réunis aux bornes d'un galvanomètre sensible, il se produit une déviation qui conventionnellement représente l'indice de nutrition IN de l'eau minérale étudiée.

Le sens de la déviation ne dépend pas du sujet qui fait l'expérience, mais uniquement de l'eau minérale étudiée, lorsque le courant qui se manifeste est positif, l'eau est dite positive, lorsqu'il est négatif l'eau est dite négative ; lorsque l'aiguille ne dévie pas l'eau est isoélectrique. On doit signaler que cet indice de nutrition évolue au cours du vieillissement d'une eau et de négatif peut devenir positif.

La grandeur de la déviation dépend du sujet qui fait l'expérience et on peut y voir une façon de déterminer la réceptivité particulière d'un malade vis-à-vis d'une eau minérale. Dans le but de rendre cette mesure indépendante de la personne en expérience, MM. RIMATTEI et PETIT ont remplacé le sujet qui établit la liaison par un pont constitué par une solution de chlorure de potassium saturé. Les résultats de cette mesure coïncident avec ceux de l'indice de nutrition, elle a été appelée indice de nutrition simplifié : I. N. S.

L'indice de nutrition est à rapprocher de la notion de potentiel de platine qui dépend du pH et du rII, ainsi se trouverait établi un lien entre l'activité thérapeutique et le potentiel d'oxydo-réduction. Nous reviendrons en détail sur cette importante question.

B) Résultats obtenus concernant les variations en fonction du temps de ces grandeurs (vieillessement) sous l'influence des agents physiques et chimiques.

a) Influence de l'air renfermé dans l'ampoule.

Pour MM. RIMATTEI et PETIT c'est le principal agent d'altération ; l'expérimentation a porté précisément sur des ampoules scellées qui contenaient une quantité d'air variable. En désignant par R le rapport :

$$R = \frac{\text{Volume de l'eau}}{\text{Volume de l'air contenu dans l'ampoule}}$$

lorsque $R = 0,016$ la sulfuration s'annule et l'indice de nutrition négatif au début devient positif au bout de 6 jours ; lorsque R est plus petit que 0,002 ; la sulfuration varie peu et l'indice de nutrition reste négatif pendant plusieurs mois.

Ainsi lorsque une ampoule renferme 1 % de son volume d'air le pouvoir réducteur diminue dans des proportions considérables.

b) Influence de la chaleur.

Si on transforme en « eau permanente » par ébullition une certaine quantité d'eau sulfureuse, celle-ci se trouve fortement modifiée dans ses propriétés. Les sulfures sont décomposés, la conductivité diminue, le pH augmente l'alcalinité décroît. Ces modifications se produisent sous l'action combinée de la chaleur, de l'évaporation et de l'oxygène de l'air. Pour étudier l'action de la chaleur en éliminant toute autre cause d'altération, MM. RIMATTEI et PETIT ont porté à l'étuve à 70° pendant 12 heures un flacon contenant 250 cm³ d'eau des Camoins rempli sans air et surmonté d'un tube de verre fin, également rempli, de façon à permettre la dilatation du liquide.

c) Influence de la lumière :

On pouvait craindre l'action de la lumière, car par ses rayons infra-rouges ou ultra-violet de longueur d'onde voisine de 4.000 Angström, elle possède une énergie capable d'apporter à un milieu déterminé des modifications chimiques. L'action de la lumière fut étudiée sur des ampoules de verre blanc presque entièrement remplies d'eau sulfureuse des Camoins. Un lot fut placé au soleil un autre à l'obscurité. Après 10 jours de conservation dans ces conditions les deux lots ne présentaient pas de différence de composition notable. La même expérience réalisée avec de l'eau de Labassère exposée dans un flacon de verre vert pendant plusieurs mois a donné les mêmes résultats,

d) *Influence du Ph.*

Trois échantillons de 200 ^{cm}³ d'eau des Camoins ont été additionnés : le 1^{er}, de 2 ^{cm}³ d'acide sulfurique au demi ; le 2^{me}, de 2 ^{cm}³ de lessive de soude et le 3^{me}, de 2 ^{cm}³ d'eau distillée. Dans ces échantillons laissés à l'air libre pendant 60 heures, l'évolution en milieu ordinaire a été la plus rapide ; en milieu alcalin, les sulfures sont restés inaltérés et en milieu acide, l'évolution a été relativement lente.

L'eau des Camoins acidifiée progressivement révèle un net pouvoir tampon, l'eau complètement évoluée a une courbe de neutralisation qui a la même allure.

L'eau de Challes en évolution possède encore un certain pouvoir tampon, lorsqu'elle a complètement évolué, ce dernier a disparu. L'eau de Labassère n'est pas tamponnée.

c) *Influence des micro-organismes :*

De l'eau des Camoins-les-Bains conservée à l'obscurité dans une bouteille contenant une certaine quantité de Barégine (micro-organismes existant aux abords des griffons) a vu sa sulfuration augmenter considérablement au bout de dix-huit mois.

Nous retiendrons de cette étude de MM. RIMATTEI et PETIT, l'action prédominante de l'oxygène de l'air en présence avec l'eau sulfureuse, même lorsque la quantité d'air contenue dans les récipients est faible ($R = 0,016$).

La valeur du pH intervient dans l'oxydation de l'eau minérale par l'air pour les eaux sulfureuses étudiées ; un pH élevé stabilise les sulfures, s'oppose donc à leur oxydation, mais dans les conditions normales du vieillissement, le pH lui-même varie peu.

La chaleur et la lumière sont sans influence sur la conservation de l'eau sulfureuse lorsqu'elle est renfermée dans des récipients bien clos (ampoules de verre scellées à la lampe).

De la barégine introduite dans le flacon contenant l'eau sulfureuse augmente considérablement le pouvoir réducteur de celle-ci. L'expérience de MM. RIMATTEI et PETIT montre qu'il y a là un facteur non négligeable de la conservation ; il est donc nécessaire de rechercher dans une eau sulfureuse les êtres vivants qu'elle peut contenir et d'étudier leur comportement si on veut connaître l'évolution de cette eau en essayant notamment de mettre en évidence la relation qui existe entre l'action exercée par ces microbes et celle un peu mieux connue des facteurs physico-chimiques ; c'est dire que les travaux de MM. RIMATTEI et PETIT que nous venons de résumer nous conduisent directement vers le but que nous avons défini dans notre introduction,

2°) ETUDE THEORIQUE DE LA BIOLOGIE DES EAUX SULFUREUSES.

Le 12 août 1833, LONGCHAMPS présentait à l'Académie des Sciences son mémoire sur la Barégine : « J'ai appelé Barégine, disait-il, une matière azotée que j'ai trouvée pour la première fois à Barèges dans son plus grand état de pureté... » ⁽⁷⁾

De nombreux naturalistes avaient déjà étudié avant lui cette substance que l'on trouve à peu de distance de l'émergence des sources d'eau sulfureuse et chacun lui avait donné un nom ; ce qui explique la confusion qui existe pour désigner ces dépôts organiques. C'était tantôt des dépôts floconneux, filamenteux en plaques muqueuses, tantôt des masses mucilagineuses, membraneuses, compactes, stalactiformes, etc..., aussi les noms proposés rappelaient l'origine : Luchonine (Bonan), Pyrénéine (Fontan), Daxine (Astrié), St-Sauvéline (Favas), Plombérine (Vauquelin), etc...

De nos jours on utilise soit le terme de Barégines, soit le terme général de Gléines, étant entendu que tous ces mots désignent la même chose.

Dans la composition de la Gléine, il y a lieu de distinguer d'une part les êtres vivants et d'autre part la substance organique qu'ils sécrètent. En dehors d'une microfaune variée pouvant être constituée par des Rotifères Monades, Entomostracés, Annélides, Anguillules, nous retiendrons particulièrement la présence d'êtres organisés dont l'activité est inséparable de la composition en produits sulfurés du milieu.

Quelle que soit leur complexité nous les diviserons en :

1° Sécreteurs de Barégine,

2° Minéralisateurs,

a) Minéralisateurs oxydants (Thiothrix, Beggiatoa, Sulfobactéries rouges, Ferrobactéries, etc...)

b) Minéralisateurs réducteurs dont les plus importants sont les Sporovibrio.

Les sécreteurs de gléines comprennent des Cocci, Bacterium, Bacillus, Strepto et Diplobacterium rendant le lait visqueux, des Streptobacterium, Spirillum, Leptothrix, Cladothrix qui, par le gonflement de leur membrane pectique reproduisent cette zoogléa typique.

A la partie supérieure des colonies vivent les Minéralisateurs oxydants et à la partie inférieure les Minéralisateurs réducteurs ; les premiers oxydent l'hydrogène sulfuré du milieu et fond déposer le soufre, les seconds réduisent les sulfates et dégagent de l'hydrogène sulfuré ; cet hydrogène sulfuré se combine avec le fer du milieu ou celui des ferrobactéries et produit les dépôts noirs de sulfure de fer que l'on observe à la partie intérieure des colonies.

Des auteurs comme CERTES et GARRIGOU en 1886 pensent que des bactéries ne peuvent vivre à une trop grande profondeur en raison de la température élevée et que les sulfobactéries étant anaérobies ces auteurs ne peuvent concevoir que des êtres vivants peuvent avoir un rôle dans la genèse des eaux sulfureuses ; actuellement l'action biochimique souterraine des bactéries anaérobies est reconnue par les géologues qui lui attribuent entre autres la constitution de certains gisements de sulfure de zinc du Missouri et peut-être même la formation des poches de pétrole. Nous pouvons donc admettre que les Gléïnes colonies flottantes d'algues et de microbes sont le siège de nombreux processus chimiques et physiologiques et prolongent dans une certaine mesure l'action qui se produit dans le sol.

Depuis fort longtemps, on a parlé pour les eaux minérales de milieu vital, d'eau vivante et cette notion qui se nuançait de mystère n'était pas pour déplaire à des praticiens empiristes, qui trouvaient ainsi une réponse facile et d'un grand effet sur le public, pour tenter d'expliquer la différence d'action entre « l'eau minérale naturelle » et une eau synthétisée à partir des éléments de l'analyse, ou même l'eau conservée sans précautions.

Pour reprendre cette idée sous une forme moins simpliste nous considérerons l'eau minérale à l'émergence comme un système complexe dont l'évolution dépend des êtres vivants qu'elle contient.

En effet, d'une part nous avons un liquide contenant les différents gaz et sels à l'état dissous et ionisé, les grosses molécules organiques soit dissoutes, soit à l'état de colloïdes ; cette phase aqueuse constituant probablement l'eau active physiologiquement ; d'autre part, les micro-organismes qui continuent leur vie et modifient la composition du liquide. Dès que l'eau sort du sol, les conditions de vie n'étant plus les mêmes du fait des influences extérieures (action de l'air), l'équilibre physiologique et physico-chimique est rapidement rompu ; l'eau minérale dégénère et l'action thérapeutique semble aussi disparue.

La barégine est utilisée dans certaines stations thermales, sous forme de boues dans un but curatif ; certains ont voulu voir dans les êtres vivants qui sont à l'origine de ces boues leur principe

actif ; mais il semble bien que c'est plutôt à cause du soufre qu'elles contiennent et par leurs propriétés mécaniques et physiques que ces boues ont une action thérapeutique.

On voit l'importance de la vie dans les eaux sulfureuses, c'est pourquoi nous avons essayé de reconnaître les espèces microbiennes vivant dans notre eau sulfureuse et de rapprocher leur activité biologique des variations des propriétés physico-chimiques du milieu.

i (21)

ETUDE BACTERIOLOGIQUE SPECIALE DE L'EAU D'URIAGE.

a) RECHERCHE DES ANAEROBIES REDUCTEURS DE SULFATES.

Pour cette étude, pour laquelle nous n'avions pas la formation ni l'expérience nécessaires, nous nous sommes adressés au professeur A.-R. PREVOT, chef de service à l'Institut Pasteur de Paris, qui a bien voulu s'intéresser à nos recherches. Dans ce but, nous lui avons envoyé, le 6 novembre 1948, des échantillons ainsi prélevés :

Echantillon N° 1. — Un litre d'eau telle qu'elle coule au Laboratoire de mise en ampoules. Le flacon utilisé était une bouteille d'un litre, type « canette de bière », à fermeture caoutchouc. Nous avons fait arriver l'eau au fond de la bouteille par un tube en verre et nous avons laissé le tout déborder 30 minutes.

Puis nous avons retiré le tube rapidement et bouché la bouteille de façon à ce qu'il n'y ait aucune bulle d'air.

La bouteille et le tube avaient été stérilisés au Poupinel à 180° 30 minutes. Le joint en caoutchouc a été stérilisé par ébullition.

Echantillon N° 2. — Cet échantillon a été prélevé dans un canal d'évacuation du trop plein d'un réservoir d'eau minérale.

Lorsque l'Etablissement Thermal est fermé, l'eau s'écoule en abondance par ce canal et on peut y noter une quantité notable de Gleïnes.

L'échantillon a été prélevé de façon à avoir une certaine quantité de gléines dans le fond du récipient. Ces deux échantillons ont été expédiés le jour du prélèvement à l'Institut Pasteur de Paris, dans un emballage les protégeant contre les variations de température.

Le professeur PREVOT nous a fait connaître le résultat de ses recherches le 15 décembre 1948.

L'échantillon N° 1 ne contenait aucun des microbes recherchés.

L'échantillon N° 2 contenait un sulfato-réducteur strict en abondance. Mais il n'a pas été possible d'entretenir une culture pure suffisamment longtemps pour pouvoir le déterminer.

Sans vouloir anticiper sur les travaux qui seront entrepris à l'Institut Pasteur sur le Sulfato-réducteur trouvé dans l'échantillon N° 2 (ces travaux étant actuellement arrêtés par la difficulté qu'il y a à cultiver suffisamment longtemps le microbe pour pouvoir l'isoler à l'état pur) nous pouvons déjà tirer quelques conclusions de ce premier examen :

Tout d'abord, la présence abondante d'un sulfato-réducteur strictement anaérobie à une faible distance du griffon, montre que l'hydrogène sulfuré de l'eau d'Uriage peut bien provenir en partie de la présence de réducteurs de sulfates dans le sol. Le mécanisme général de la réaction peut se schématiser par la réaction :



ou R est un radical organique et M le métal des Sulfates. C'est le radical R du donneur d'H² qui permet de différencier les espèces de Sulfato-réducteurs. Dans le cas d'Uriage, le donneur sera à préciser, mais c'est probablement un glucide synthétisé par une algue ou le plancton végétal.

Ce Sulfato-réducteur ne se retrouvant plus en quantité suffisamment importante dans l'eau du Laboratoire, on peut supposer qu'il n'a pu survivre au transport, ne trouvant pas dans l'eau filtrée, les éléments nécessaires à sa conservation. Comme, d'autre part, il serait à l'origine de l'Hydrogène Sulfuré, son influence ne pourrait être que favorable à la conservation de l'eau s'il pouvait continuer son activité dans les ampoules.

b) RECHERCHE DES AUTOTROPHES OXYDANTS.

L'étude de ces êtres vivants nous retiendra plus longtemps car ce sont eux qui sont les destructeurs de l'hydrogène sulfuré et qui sont une des causes de la dégénérescence de l'eau sulfureuse.

Nous avons eu la bonne fortune de pouvoir confier cette étude, si particulière, à Madame Hélène WINOGRADSKY, assistante à l'Institut Pasteur, dans le service du professeur DUJARIC DE LA RIVIERE et fille de Monsieur WINOGRADSKY, un des savants qui font autorité dans la question des Sulfuraires.

Les résultats que nous allons exposer sont extraits d'une étude de Madame WINOGRADSKY ⁽⁹⁾ à laquelle nous avons fait deux expéditions de prélèvements.

La première : le 5 janvier 1948, contenait dans un emballage isolé avec de la poudre de liège :

a) un prélèvement dans le canal, dont nous avons déjà parlé, comportant de la barégine et de l'eau la surnageant (échantillon N° 1).

b) un échantillon N° 2 contenant, en majeure partie le dépôt jaune qui se produit dans les canalisations de verre d'évacuation d'eau minérale au Laboratoire ;

c) en outre, trois litres d'eau minérale telle que nous la mettons en ampoules, aseptiquement prélevée en flacons stérilisés.

La deuxième : qui contenait des échantillons prélevés dans des conditions analogues, a été faite le 28 mai 1948. Cet envoi comportait, en outre, des ampoules non stérilisées, remplies sous azote (lot d'ampoules 1 et 2) et des ampoules remplies sous air (lot d'ampoules 3 et 4).

Dans le dépôt des trois flacons, on a trouvé :

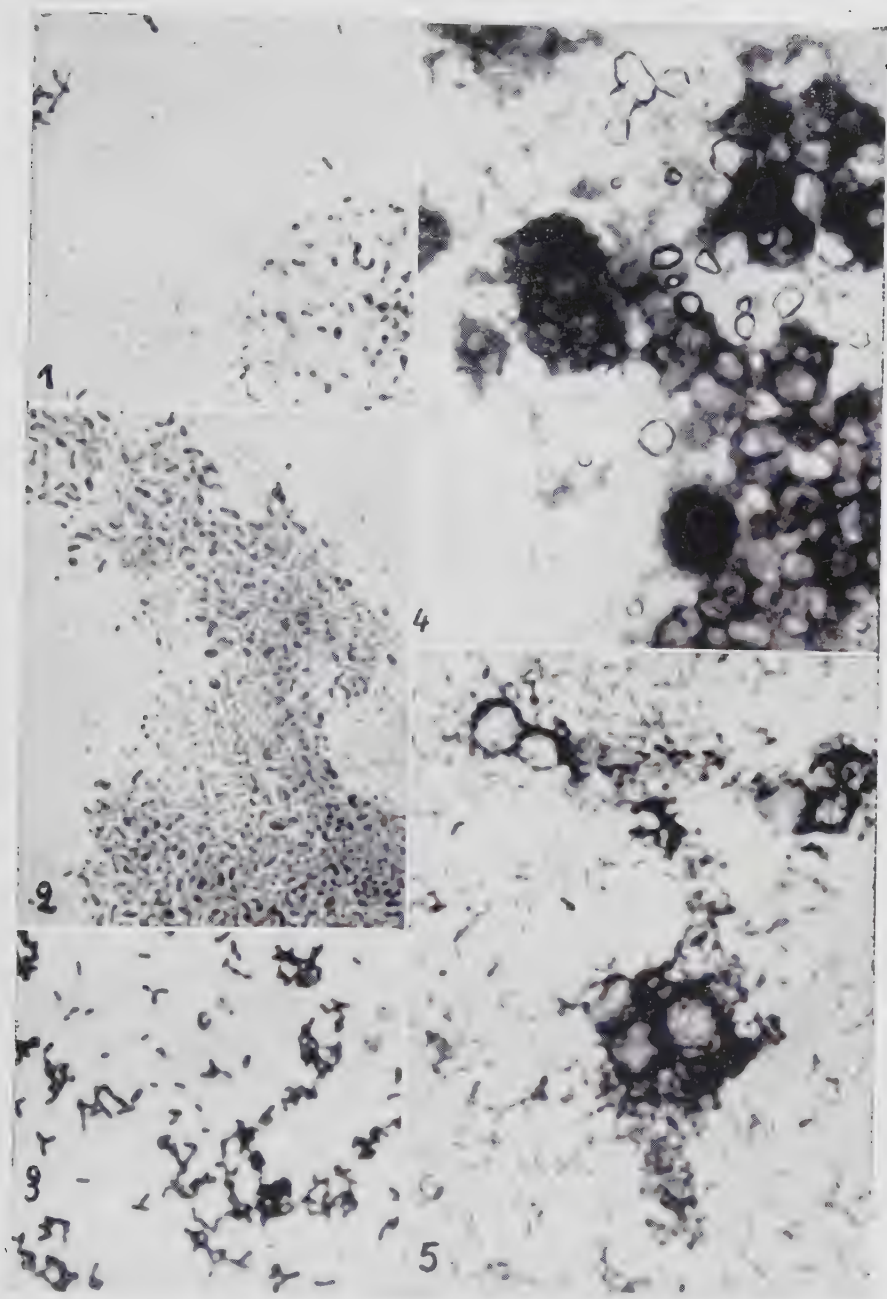
1°) des Leucothiobactéries filamenteuses, au moins trois espèces :

Beggiatoa Alba
Beggiatoa Media (leptomitiformis)
Beggiatoa Minima

Dans le liquide surnageant et dans les dépôts, on a trouvé :

Thiobacillus Thioparus ou espèces voisines
et Thiobacillus Thiooxydans.

Dans les ampoules non stérilisées, on a trouvé la présence des deux espèces que nous venons de citer.



- 1 — Examen direct de la pellicule de soufre à la surface du prélèvement n° 1 : Thiobacillus thiooxydans mélangé à d'autres microbes.
- 2 — Culture mélangée. Premier repiquage de la culture brute en milieu liquide Th. Thioparus et espèces voisines.
- 3 — Culture brute ; mélange de Th. Thioparus et espèces voisines.
- 4 — Culture sur plaque de gélose, deuxième repiquage après la culture brute. Mélange de Th. Thioparus et de cristaux et bulles de soufre.
- 5 — Mélange de Th. Thioparus et espèces voisines en milieu liquide. Préparation traitée par l'alcool absolu. Observer les emplacements laissés par les bulles et cristaux de soufre dissous.

Nous allons étudier chacune de ces espèces, en indiquant les moyens utilisés pour les mettre en évidence et nous passerons en revue les propriétés biologiques de chacune d'elles.

Sulfobactéries incolores ou Leucothiobactéria

Nous n'étudierons que le genre *Beggiatoa* de la famille des Beggiatoaceae.

Les *Beggiatoa* ont été trouvés dans l'échantillon N° 2, contenant de l'eau minérale avec gleïne par examen direct à l'état frais.

ETUDE MORPHOLOGIQUE ET ANATOMIQUE.

A l'examen microscopique, les *Beggiatoa* se présentent comme des filaments mobiles qui s'avancent en rampant et en s'enroulant autour de leur axe. Ces mouvements ont été décrits par WINOGRADSKY ⁽¹⁰⁾ :

« Le genre *Beggiatoa* est caractérisé par des filaments longs, incolores, flexueux, démunis de gaines, toujours libres et mobiles d'un mouvement rampant sur surfaces solides. Les filaments sont composés d'articles cylindriques, dont la longueur varie du simple au double, ce qui indique la division intercalaire par sissiparité. ».

Les mouvements, bien que lents, sont possibles grâce à l'élasticité de la membrane.

Les filaments sont cloisonnés transversalement et on ne distingue pas un noyau nettement différencié à l'intérieur des cellules.

BUTSCHLI ⁽¹¹⁾ remarque la présence de petits grains colorés par l'hématoxyline. Ces grains de Chromatine se présentent sous forme d'inclusions protoplasmiques rondes ou ovales de 0,5 μ à 0, μ 6 et joueraient le rôle du noyau (W. BENECKE) ⁽¹²⁾.

« Il vaut mieux considérer les *Beggiatoa* comme dépourvus de « noyaux et indiquer simplement la présence de granulations spéciales, dont la nature morphologique et physiologique nous est « inconnue et qui prennent intensivement les colorants spéciaux « aux corps nucléaires » (TRABAUD) ⁽¹³⁾.

Le Protoplasma apparaît comme une masse incolore englobant les vacuoles remplies de suc cellulaire. Outre les grains de Chromatine dont nous avons signalé la présence, on note la présence de deux autres sortes d'inclusions protoplasmiques.

A) Les granules ou globules de soufre colloïdal.

B) Les grains d'amyline.

A) *Granules de soufre*. — Bien que leur présence ne soit pas particulière à l'espèce *Beggiatoa*, ce sont les éléments les plus typiques.

Le soufre est un des constituants essentiels de la matière vivante, mais dans les Sulfuraires de cette famille, il se trouve en quantité abondante, on a montré que pour ces êtres, vivants dans un milieu sulfuré, la quantité de soufre qu'ils renferment est proportionnelle à la richesse en soufre de ce milieu. (CRAMER en 1870 et confirmé par COHN en 1875).

Fait remarquable, ce soufre se trouve à l'état de véritables gouttelettes et non engagé dans une combinaison organique.

D'après BUTSCHLI et WINOGRADSKY ⁽¹⁴⁾, ces granules se trouveraient à l'état sirupeux, dispersés, non agglomérés dans l'élément vivant, ils peuvent donner un mélange de soufre amorphe et cristallisé, lorsque l'élément est tué par l'acide acétique, ou la mort naturelle du filament lorsqu'il y a formation de cristaux.

Lorsque les *Beggiatoa* sont placés subitement dans un liquide pauvre en Hydrogène sulfuré, ces granules de soufre diminuent de volume et disparaissent peu à peu, suivis après 24 heures par la mort du filament. Si au contraire, on replace les *Beggiatoa* désulfurés dans un milieu riche en Hydrogène sulfuré, le dépôt de soufre intracellulaire recommence à apparaître.

B) *Les grains d'amyline*. — Comme dans tous végétaux, on remarque à l'intérieur du protoplasma la présence de grains d'un hydrate de carbone, jouant le rôle de réserve.

Ces granulations sont mises en évidence par la solution iodo-iodurée de LUGOL qui donne une teinte allant du brun clair au bleu noir.

REPRODUCTION.

La division se fait par scissiparité. Une cloison apparaît vers le milieu de la cellule mère et donne deux cellules filles. Ainsi le filament s'allonge, lorsqu'il atteint une certaine longueur, il se

brise en plusieurs tronçons. On n'a jamais noté la présence de spores bien caractérisées.

DIFFERENCES ENTRE LES ESPECES TROUVEES DANS LA SOURCE D'URIAGE.

Les classifications des Beggiatoa reposent sur le diamètre, car seul celui-ci peut fournir un caractère spécifique.

Nous adopterons la classification de WINOGRADSKY :

Beggiatoa Alba (WINOGRADSKY) de 2 γ 5 à 4 γ de diamètre.

Ces cellules ont environ 3 μ comme longueur minimum. C'est l'espèce la plus commune et on l'a trouvé à Aix-les-Bains. Elle se rencontre dans les eaux sulfureuses mais aussi sur la vase des eaux douces et salées, contenant H²S fourni par la putréfaction des matières organiques.

Beggiatoa Media. — (WINOGRADSKY) ou Leptomitiformis. (MENECHINI 1843) ressemblent à *Beggiatoa Alba*, mais mesurent de 1 à 2,5 .

Beggiatoa Minima. — (WINOGRADSKY 1888) mesure jusqu'à 1 μ d'épaisseur.

PHYSIOLOGIE DES BEGGIATOACEES.

A la suite de ses expériences, PLAUCHUT en 1877 se crut autorisé à attribuer aux Beggiatoa la réduction des sulfates en H²S mais la façon dont ses expériences ont été conduites, si elles permettent de soutenir que le dégagement d'H²S, à partir de la décomposition des sulfates, est bien d'origine biologique, ne permettent pas d'affirmer que ce sont les Beggiatoa qui en sont la cause. En effet, en même temps que les Beggiatoa, des anaérobies sulfato-réducteurs ont été certainement introduits dans les liquides.

C'est Sergius WINOGRADSKY ⁽¹⁴⁾ qui, en 1887-1888, détruisit complètement les idées émises jusqu'à cette époque au sujet de la genèse des eaux sulfureuses naturelles et des fonctions physiologiques des Beggiatoa.

C'est lui qui fit la distinction entre les bactéries réductrices et oxydantes, trouvant paradoxal qu'une même bactérie puisse posséder ces deux fonctions.

Ses expériences mirent en évidence la disparition de l'hydrogène sulfuré et l'augmentation de la quantité de sulfate dans le milieu où se trouvent des Beggiatoa. De même, il montra que placés

dans de l'Eau ordinaire, les granules de soufre inclus dans le protoplasme de ces organismes, ne tardent pas à disparaître, phénomène précédant de peu la mort des filaments.

Ainsi, le soufre est un aliment de réserve, sans lequel toute vie est impossible pour ces êtres vivants. Schématiquement, on peut représenter ceci par les équations :



réaction qui se passe lors de l'oxydation à l'air libre de l'hydrogène sulfuré mais qui est considérablement accrue par la bactérie. Le soufre accumulé dans le protoplasme est brûlé au fur et à mesure des besoins, en donnant de l'acide sulfurique.



L'acide sulfurique formé est neutralisé au fur et à mesure de sa formation par les carbonates ; par exemple le carbonate de chaux :



Ainsi, en fin de compte, apparaît comme terme ultime de la décomposition de l'hydrogène sulfuré : du Sulfate de chaux et du gaz carbonique.

Les réactions 1 et 2 étant fortement exothermiques, fournissent à la bactérie l'énergie nécessaire pour l'accomplissement de ses phénomènes vitaux, nutrition et croissance. Cette énergie est utilisée à la réduction des composés carboniques et, lorsque la cellule se trouve dans des conditions de vie défavorables, elle sert à la constitution de réserves sous la forme d'hydrates de carbone, dont nous avons noté la présence dans le protoplasme.

On a, enfin, observé que les *Beggiatoa* ne peuvent vivre dans un milieu complètement dépourvu d'oxygène, faute de quoi elles disparaissent, mais un excès de la tension de l'oxygène leur est également nuisible.

Ces caractères physiologiques, qui mettent en relief la fragilité de ces organismes, expliquent la difficulté qu'il y a à cultiver les *Beggiatoa* à l'état pur.

Elles ne peuvent se développer que dans une eau courante faiblement sulfurée (un excès d' H^2S absorbe tout l'oxygène).

KIEL et BAVENDAM purent, cependant, obtenir des cultures grâce à un dispositif assez complexe, réalisant les cultures en milieu sulhydrique. La présence des *Beggiatoa* n'a pas été décelée dans les échantillons contenant l'eau telle qu'elle coule au laboratoire.

En effet, il n'a pas été fait de tentatives de culture à l'aide de l'appareil de KIEL et BAVENDAM. Si de tels organismes pouvaient

se développer dans des ampoules scellées, leur action ne serait sans doute pas négligeable, car ces sulfobactéries absorbent 4 à 5 fois leur poids d'hydrogène sulfuré par jour.

Remarquons, en passant, que dans le cas de cette espèce comme dans celui de celles que nous verrons tout à l'heure, la conservation de l'eau sulfureuse en atmosphère d'Azote ne peut qu'être favorable à l'arrêt de l'activité des Beggiatoa qui pourraient se trouver dans l'eau minérale.

Sulfobactéries ne déposant pas de soufre à l'intérieur de leurs cellules : EUTHIOBACTERIA

A) SULFOBACTERIES THIOSULFATEES OU DE L'ACIDE THIONIQUE :

NATHANSON ⁽¹⁵⁾, étudiant en 1902, l'eau du golfe de Naples, découvrit un bacille qui oxydait les solutions d'hyposulfite. Étudié en 1904 par BEIJERINCK, ce même bacille fut appelé par lui Thiobacillus Thioparus.

Dans les différents échantillons expédiés à l'Institut Pasteur, Madame WINOGRADSKY a retrouvé de façon à peu près constante, ce même Thiobacillus Thioparus ou espèces à fonctions analogues. Le mode opératoire utilisé pour isoler ce Thiobacillus a été le même que celui indiqué par BEIJERINCK ⁽¹⁶⁾.

Dans un erlenmeyer, on place une couche peu épaisse du milieu minéral ci-dessous :

Hyposulfite de soude	0,50 grs
Bicarbonate de soude	0.10 grs
Phosphate dipotassique	0,02 grs
Chlorure d'ammonium	0,01 grs
Chlorure de magnésium	0,01 grs
Eau Q. S. P.	100 cc

BEIJERINCK ⁽¹⁶⁾ recommande de ne pas stériliser pour éviter la décomposition du bicarbonate de soude. On opère donc aseptiquement avec de l'eau stérile, dans des récipients stériles.

On ensemence par de l'eau à étudier ou une trace de dépôt et on porte à l'étuve à 28 ou 30°.

Au bout de 2 ou 3 jours, on aperçoit à la surface une couche de soufre libre où se meuvent de nombreux petits bâtonnets.

Pour obtenir la culture pure, on utilise le même milieu solidifié avec de l'agar-agar (2 %), on ensemence avec la pellicule soufrée

obtenue en milieu liquide et on distingue facilement les colonies de bactéries thiosulfatées des impuretés qui les accompagnent par la forte élimination de soufre. On peut alors réensemencer en milieu liquide.

Le pH du milieu qui était au début de 9 environ descend jusqu'à 5, après quelques jours.

En résumé la présence de *Thiobacillus Thioparus* est caractérisée par :

1°) L'apparition d'une pellicule de soufre à la surface du milieu liquide.

Après étalement de cette pellicule, fixation par les vapeurs d'acide osmique et coloration de Gram, on voit une grande quantité de Bactéries gram négatif, entourant des globules réfringentes et même des cristaux solubles dans l'alcool absolu et que l'on peut considérer comme du soufre.

3°) Le pH du milieu de culture s'abaisse de 9 à 5 environ.

Les ensemencements faits avec :

les échantillons 1 (eau avec gléïne)

— — — 2 (dépôt laissé au Laboratoire par l'eau dans des canalisations de verre) pour l'envoi de janvier 1948 et l'échantillon avec gléïne fait en mai 1948, ont tous été positifs et ont donné :

Le dépôt de soufre.

L'apparition de *Thiobacillus Thioparus* ou espèces voisines, comme en témoignent les microphotos jointes.

La diminution du pH du milieu de culture.

Les liquides contenus dans les ampoules et non tyndalisées, ont tous donné une diminution du pH, ce qui est l'indice d'une activité certaine et dans un erlenmeyer ensemencé avec l'ampoule N° 4 (ampoule remplie sous air) la présence de la pellicule de soufre et de bactéries a été très nette.

La présence de *Thiobacillus Thioparus* ou espèce de fonction analogue, est donc démontrée et mise en évidence de façon indiscutable dans l'eau telle qu'elle arrive en Laboratoire.

MORPHOLOGIE. — L'espèce observée par nous de *Thiobacillus Thioparus* est un bâtonnet mince de 1,5 à 2 μ . de long, très mobile. Il ne produit pas de spores. Il est gram négatif.

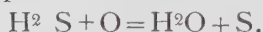
PHYSIOLOGIE. — En milieu Thiosulfaté, l'hyposulfite est oxydé : $S^2 O_3 Na^2 + O = SO_4 Na^2 + S$.

Les globules de soufre s'agglomèrent en grosses bulles auxquelles adhèrent les bactéries qui les ont engendrés.

Cette réaction exothermique libère l'énergie nécessaire à la bactérie pour élaborer sa propre substance carbonée, à partir du CO_2 libre du bicarbonate ou des carbonates.

Dans le milieu de Beijerinck, l'hyposulfite est la source d'énergie, le bicarbonate la source de carbone, le chlorure d'ammonium, la source d'azote.

L'hyposulfite peut être remplacé par du Tétrathionate, mais la réaction réussit moins bien. Dans les eaux naturelles où la présence de l'hyposulfite est rare, c'est surtout l'hydrogène sulfuré libre ou libéré des sulfures par CO_2 qui est utilisé comme donneur d'énergie. La réaction très simple que nous avons déjà rencontrée rend compte du phénomène :



La reproduction se fait par scissiparité transversale.

En rapprochant les caractères des cultures de *Thiobacillus Thioparus* de l'apparition d'un dépôt de soufre dans des ampoules non stérilisées, on peut penser que c'est un des principaux responsables de l'oxydation de l'eau d'Uriage.

La plus ou moins grande importance de la pellicule de soufre variant avec la présence ou l'absence d'azote s'explique fort bien par le fait que la Bactérie est aérobie.

B) *SULFOBACTERIES OXYDANT LE SOUFRE LIBRE*

Ce groupe comprend les germes les plus actifs de l'oxydation du soufre.

Le fait que le soufre libre est oxydé dans le sol en sulfate, avait déjà été signalé par MARES en 1869 et également par Mc LEAN en 1918, mais c'est à A. WAKSMAN ⁽¹⁷⁾ et à J.-S. JOFFE que revient le mérite d'avoir exposé le mécanisme de cette oxydation et de l'avoir attribuée à un organisme très abondant dans le sol :

Thiobacillus Thiooxydans que l'on rattache au groupe des sulfobactéries atypiques.

Thiobacillus Thiooxydans a été trouvé par Madame WINOGRADSKY dans tous les échantillons qui lui ont été expédiés, ainsi que dans les ampoules non stérilisées.

Le milieu qui a été utilisé et qui est préconisé par WAKSMAN contient :

Sulfate d'Ammonium 0,2 %
Phosphate Dipotassique 0,1 %
Sulfate de Magnésium 0,05 %
Chlorure de Potassium 0,05 %
Traces de sulfate ferreux.
Soufre en poudre 1 %.
Phosphate tricalcique 0,25 à 1 %.

Le mélange est réparti par 100 cc dans les Erlenmeyer de 250 cc et stérilisé en vapeur fluente pendant 30 minutes, trois jours consécutifs. Les flacons sont ensuiteensemencés. Dans le cas où la culture est positive, le contenu des flacons devient trouble en 4 à 5 jours et l'examen microscopique décèle la présence d'un bâtonnet de 0,5 à 0,8 μ non mobile. Le plus souvent les cultures sont souillées par des moisissures et leurs spores au début.

Le caractère de culture le plus important est la diminution du pH qui de 5,6 à 6,2 au début, s'abaisse jusqu'à pH 1,00 en même temps on observe une diminution du dépôt de soufre.

Cette faculté des *Thiobacillus Thiooxydans* de se développer à un pH très acide facilite l'obtention de cultures pures. Pour cela on repique successivement la culture dans les milieux dont le pH a été préalablement amené au départ à pH 2 — 3 par utilisation d'acide phosphorique et de phosphate monopotassique. On arrive, ainsi, à obtenir une culture dont la pureté est démontrée par des examens microscopiques répétés, par une croissance uniforme dans des milieux liquides normaux et, par le fait qu'aucun organisme ne se développe par inoculation dans un milieu bactériologique ordinaire.

Il est impossible de cultiver ce bacille sur un milieu à Agar-Agar ou gel de silice, car il supporte mal le milieu solide.

En milieu liquide, les cultures présentent un trouble uniforme dense, sans aucune surface de croissance ou formation de sédiment.

En résumé, les caractères culturels sur lesquels on s'est basé pour la détermination de *Thiobacillus Thiooxydans* sont les suivantes :

- 1°) Apparition d'un trouble dans le milieu à soufre et disparition progressive du soufre ;
- 2°) Examen microscopique ;
- 3°) Le pH du milieu de culture s'abaisse de 5,6 à 6,2 au début jusqu'à 1,0 et 0,8.

Dans l'échantillon N° 1 (eau avec gleïne) en quelques jours on a observé l'apparition d'une pellicule constituée par un amas de *Thiobacillus Thiooxydans*, mélangés à du soufre oxydé chimiquement. (Voir microphoto).

L'ensemencement à l'aide de cette pellicule a donné des résultats précédemment énoncés avec le milieu à soufre.

Les ensemencements pratiqués avec les lots d'ampoules :

1 - 2 (Ampoules avec azote).

3 - 4 (Ampoules sous air)

ont produit dans le milieu minéral à soufre un abaissement du pH jusqu'à pH 3 en 18 jours. Nous pouvons donc conclure à la présence de *Thiobacillus Thiooxydans* dans l'eau telle qu'elle arrive au Laboratoire.

MORPHOLOGIE

L'aspect microscopique de *Thiobacillus Thiooxydans* est très voisin de celui de *Thiobacillus Thioparus*, espèce observée par nous.

Les cellules végétatives sur le milieu synthétique utilisé sont des petits bâtonnets aux extrémités arrondies, se présentant séparément, quelquefois par deux, rarement par trois. La plupart ont moins de 1 γ de long et moins de 0,5 γ de diamètre. Il n'y a pas de formation de spore.

Les cellules ont un stade plus mobile au début. L'organisme se colore bien au Violet de Gentiane et au Bleu de Méthylène. Il est gram positif.

PHYSIOLOGIE

Source de Carbone : L'organisme tire ses besoins de carbone du gaz carbonique contenu dans l'atmosphère. L'addition de carbonate ou de bicarbonate au milieu gêne le développement de la culture car elle élève la valeur du pH qui s'écarte ainsi de l'optimum situé aux environs de 2,6 — 2,8.

Source d'énergie : Le Soufre libre est la plus importante source d'énergie utilisée par cet organisme qui est strictement autotrophe. Il peut être remplacé par l'hyposulfite, mais pas par l'hydrogène sulfuré et les Sulfures.

L'addition du Glucose ou d'autres substances organiques comme le glycérol, l'alcool, le mannitol, semble avoir une influence favorable sur le développement des cultures, mais elle favorise également le développement des moisissures.

Besoins minéraux : Des traces de K, Mg, Ca, Fe, sont suffisantes pour assurer le développement des bactéries et sont apportées par les composés chimiques utilisés pour la préparation des milieux.

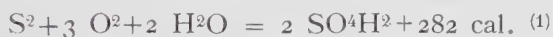
Source d'Azote : Les besoins sont très faibles étant donné l'accroissement très petit de l'organisme. Les meilleures sources d'Azote sont les sulfates ou les Sels d'Ammonium, d'acides organiques.

Source d'Oxygène : L'organisme est aérobie strict ; il utilise l'oxygène de l'air pour l'oxydation du Soufre en SO_4H^2 .

Influence de la température : La température optima pour l'activité de Thiobacillus Thiooxydans est environ de 28 à 30°. La croissance et l'oxydation du Soufre sont ralenties à des températures voisines de 18 à 37°.

La température de 60° est suffisante pour tuer l'organisme.

Mécanisme de l'oxydation du soufre : Le soufre est oxydé d'après la réaction :



L'acide sulfurique formé abaisserait trop rapidement le pH et l'amènerait rapidement en dessous du pH optimum, s'il n'était neutralisé au fur et à mesure de sa production. Les carbonates alcalins sont impropres car ils influencent par trop le pH.

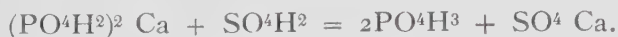
Le sel qui convient le mieux est le Phosphate tricalcique : l'acide sulfurique agit sur le phosphate tricalcique et le transforme d'abord en phosphate dicalcique :



Le phosphate dicalcique est transformé en phosphate monocalcique :



Ce phosphate monocalcique étant finalement transformé en acide phosphorique et sulfate de calcium qui précipite :



Lorsque tout le phosphate tricalcique a disparu, l'acide sulfurique s'accumule et le pH s'abaisse, ce qui ralentit l'activité de la croissance bien que l'organisme puisse vivre à un pH de 0,6.

L'énergie libérée par la réaction (1) permet à la bactérie d'accomplir ses phénomènes vitaux.

AUTOTROPHIE

Ainsi, cette bactérie qui tire son énergie du Soufre inorganique, le carbone du gaz carbonique de l'atmosphère, l'azote du sulfate d'ammonium, est bien un organisme autotrophe.

WAKSMAN voit dans ces bactéries la première forme d'êtres organisés qui ont pu apparaître sur la terre, préparant ainsi les matériaux organiques pour les autres formes de vie.

Thiobacillus. Thiooxydans ne s'attaquant pas à l'hydrogène sulfuré et aux sulfures, ne semble pas, à première vue, avoir une influence sur la conservation de l'Eau d'Uriage en ampoules. Toutefois il peut être responsable de la disparition après plusieurs mois, du dépôt de soufre flottant à la surface du liquide dans les ampoules ayant précipité par l'action de Thiobacillus Thioparus. (Comme dans le cas de Thiobacillus Thioparus, l'utilisation de l'atmosphère d'Azote pour la conservation de l'eau paraît tout à fait indiquée, cette bactérie étant strictement aérobie).

3°) BACTERIOLOGIE GENERALE DE L'EAU D'URIAGE.

Numération des germes et recherches de bactéries pathogènes.

La présence de Sulfuraires dans l'Eau d'Uriage étant nettement établie, comme nous venons de le voir, une question vient tout de suite à l'esprit : En dehors des Sulfuraires, l'Eau d'Uriage contient-elle des Bactéries Pathogènes ou non ?

Question très importante, étant donnée l'utilisation tout à fait particulière qui en est faite. Lesensemencements sur bouillon gélosé que nous faisons de temps à autre donnent des résultats irréguliers. Pendant de longues séries, tous lesensemencements restent stériles, mais parfois nous remarquons la présence de quelques colonies microbiennes, 2 à 3 par cm^3 .

Si l'on s'en tient à l'Echelle de Miquel qui permet de classer les eaux d'après le nombre de germes qu'elles contiennent par cm^3 , l'Eau d'Uriage est excessivement pure (une eau considérée comme pure peut encore contenir 100 à 1.000 germes par cm^3). Toutefois, les indications de cette échelle n'ont rien d'absolu. En effet, si une eau destinée à la boisson peut contenir une certaine quantité de

microbes, une eau destinée à être injectée ne doit pas en contenir à l'état vivant.

Même s'ils sont tués par la stérilisation, la quantité des corps microbiens ne doit pas être telle qu'elle puisse produire un abcès qui serait dans ce cas aseptique ; en effet, les cadavres microbiens sont autant de corps étrangers que l'on introduit dans l'organisme ; si le soluté est lent à se résorber, les phénomènes d'auto-défense provoquent un afflux de Phagocytes, d'où inflammation et abcès. De tels accidents ont été provoqués par des injections de solutés préparés avec des eaux distillées de fabrication ancienne, impures bactériologiquement. En outre, des travaux récents ont montré que les substances secrétées par les microbes étaient responsables des élévations de température constatées à la suite d'injections massives de solutés salins.

Il est inutile d'insister sur les graves désordres produits par l'injection de bactéries pathogènes à l'état virulent.

Nous citerons les résultats d'une étude de Bactériologie générale très poussée qui a été faite récemment par Monsieur le Professeur MOREL, sous-directeur de l'Institut Bactériologique de Lyon. Nous remercions vivement Monsieur le Professeur MOREL de nous avoir autorisé à publier les résultats des analyses qu'il a été amené à faire à la suite d'une expertise dont il était chargé ; les considérations qui vont suivre sont extraites de son rapport.

Nous citerons les examens ayant trait à l'eau minérale telle qu'elle coule à la buvette de l'Etablissement et au Laboratoire de mise en ampoules. Dans ces deux derniers cas, l'Eau a une composition chimique identique et ne semble pas altérée par son transport dans les canalisations.

Monsieur le Professeur MOREL a prélevé le 18 juillet 1947, 4 flacons de 500 cc d'eau minérale, 3 au Laboratoire de mise en ampoules et 1 à la buvette de l'Etablissement Thermal ; ceci « en prenant soigneusement les précautions d'asepsie habituelle en matière d'analyse bactériologique des eaux ». Ces échantillons transportés dans une caisse spéciale contenant de la glace ont été mis en culture à l'Institut Bactériologique de Lyon, le jour même, 4 à 5 heures après le prélèvement.

On a d'abord pratiqué sur ces échantillons les recherches qui permettent de conclure à la potabilité au point de vue bactériologique, c'est-à-dire :

1° La recherche et la numération des Bacilles Coli par la culture en bouillon phéniqué et la recherche du pouvoir indologène par la réaction de Salkowski.

2° La recherche et la numération des germes des matières fécales et putréfactives par le virage du bouillon au rouge neutre.

3° La numération des germes poussant sur plaques de gélatine après 15 jours de séjour à 18° et la caractérisation de leurs colonies suivant que celles-ci sont ou non chromogènes et sont ou non liquéfiantes de la gélatine.

Les résultats observés ont été les suivants :

Tous les échantillons n'ont révélé la présence d'aucun colibacille. Il n'a pas été trouvé, non plus, des germes des matières fécales et putréfactives. Sur plaque de gélatine, une seule colonie de microbes non chromogènes, non liquéfiantes, formés de staphylocoques blancs, saprophytes banaux de l'air et de la peau humaine a été observée provenant de l'échantillon prélevé au Laboratoire après les appareils de filtration. (Ces appareils seront décrits plus loin, mais ne peuvent en aucune façon être mis en cause).

Les résultats de cette première série d'expériences viennent donc confirmer ce que nous avons exposé plus haut. Les caractères de potabilité bactériologique de l'Eau d'Uriage sont donc, en tous points, excellents et même exceptionnels, puisque l'on n'a pas relevé la présence de Colibacilles et de germes des matières fécales, ces microbes étant les commenseaux habituels de germes redoutables, tels que ceux des groupes typhiques et paratyphiques dont la détection directe est difficile.

Dans une deuxième série de recherches, le Professeur MOREL a cherché à déceler la présence ou l'absence de microbes pouvant se comporter comme pyogènes ; ces recherches qui ne se font généralement pas dans les opérations de contrôle officiel des Eaux Minérales consommées par la voie digestive, étaient spécialement indiquées, car il s'agit d'une eau administrée surtout en injections intratissulaires.

Les 4 échantillons précédant ont donc étéensemencés sur bouillon peptoné et sur gélose.

On a obtenu :

Avec l'échantillon N° 1 (Eau de la buvette) quelques colonies de Staphylocoques blancs sur bouillon peptoné. Rien sur gélose.

Avec les échantillons N° 2 et N° 3, provenant du robinet du Laboratoire avant filtration : sur Bouillon : Néant.
sur Gélose : Néant.

Avec l'échantillon N° 4, provenant du Laboratoire après filtration : sur bouillon : très rares colonies de Staphylocoques.

sur Gélose : également quelques colonies de Staphylocoques.

Ainsi donc, on a trouvé quelques microbes pouvant se comporter comme pyogènes dans les échantillons 1 (Eau de la Buvette) et 4 (Eau qui coule au Laboratoire), mais ces microbes ne sont pas nécessairement pyogènes ; il est possible qu'ils ne soient que des Saprophytes, hôtes fréquents de l'air et même de la peau humaine.

Afin de répéter à une autre date ces recherches et également pour les compléter par la recherche des anaérobies, Monsieur le Professeur MOREL est revenu le 27 septembre 1947 pour y effectuer l'ensemencement direct des milieux de culture. qu'il avait apporté à partir de l'eau coulant des robinets et de l'appareil de filtration.

Il a été pratiqué dans chaque cas desensemencements en bouillon ordinaire, en gélose inclinée et en bouillon sous huile de vaseline. Tous les tubes, bouchés avec du coton stérile, ont été transportés, tenus verticalement à l'Institut Bactériologique de Lyon.

Le contenu de tous les tubes est resté stérile après un séjour de 48 heures à l'étuve à 37°5, confirmé par de nouveaux examens des tubes après 72 et 96 heures.

Les résultats de toutes ces analyses bactériologiques, effectuées par un expert particulièrement compétent, ne font que confirmer les résultats que nous obtenons personnellement lors de nos examens répétés.

L'Eau d'Uriage est une eau excessivement pure au point de vue de la bactériologie générale ; de nombreuxensemencements restent complètement stériles, mais certains révèlent la présence de quelques microbes. Pour terminer, nous laisserons au Professeur Morel le soin d'exprimer notre pensée en citant sa conclusion :

« L'examen des résultats des analyses et recherches bactériologiques effectuées à l'Institut Bactériologique de Lyon
« semble montrer que :

« 1° L'eau amenée par la Société de l'Etablissement Ther-
« mal d'Uriage au robinet de l'évier de l'Atelier de mise en
« ampoules n'est pas plus contaminée par des microbes que
« l'eau du robinet de la buvette de cet Etablissement et que
« si cette dernière eau est exempte des microbes qui pourraient
« rendre son administration par voie digestive dangereuse,
« tels que les bacilles du groupe B. Coli et des germes se ren-
« contrant dans les matières fécales ou putréfactives, le prélè-
« vement que j'ai fait au robinet de la buvette aseptiquement
« le 18 juillet 1947 contenait quelques microbes saprophytes,
« hôtes fréquents de l'air et même de la peau humaine, voi-
« sins comme forme de ceux qui peuvent se comporter comme

« pyogènes ce qui fait ressortir l'intérêt qu'il y a à stériliser
« par tyndallisation les ampoules lorsqu'il s'agit de l'admi-
« nistration de l'Eau d'Uriage en injections intratissulaires. »

CONCLUSIONS

Bien que l'Etude bactériologique entreprise ne soit pas complète et demande à être poursuivie en ce qui concerne notamment les Sulfato-réducteurs, on peut en tirer les conclusions suivantes :

Contrairement à ce qui a été maintes fois publié, l'eau d'Uriage n'est pas stérile au sens strict du mot. On a, en effet, mis en évidence, de façon indiscutable, la présence dans l'eau d'Uriage fournie au Laboratoire :

1° Des Bactéries sulfureuses *Thiobacillus Thioparus* et *Thiobacillus Thiooxydans* ou espèces voisines.

2° Des Staphylocoques dont la forme se rapproche de celle de ceux pouvant se comporter comme pyogènes.

On peut, en outre, supposer que l'Eau d'Uriage contient également un Sulfato-réducteur qui n'a pu encore être identifié et des Sulfuraires du genre *Beggiatoa*. La présence de ces organismes, constatée dans des dépôts de Barégine, permet de faire cette hypothèse.

Quoi qu'il en soit, comme le montre les numérations pratiquées, l'Eau d'Uriage contient excessivement peu de germes et en tous cas une quantité certainement très inférieure à celle contenue dans l'eau distillée utilisée pour la préparation des Solutés injectables.

L'étude théorique de la question à la suite des expériences de MM. RIMATTEI et PETIT et l'étude biologique que nous venons de présenter montre l'intérêt qu'il y a de coordonner les résultats de l'analyse physico-chimique avec ceux de l'analyse bactériologique ce qui fait l'objet de la partie expérimentale de notre travail.

CHAPITRE II

Etude Expérimentale

RAPPEL DES GRANDEURS INTERVENANT DANS LE REPERAGE PHYSICO-CHIMIQUE

Nous nous sommes trouvés devant le problème du choix des méthodes physico-chimiques à retenir comme ayant une réelle valeur pour le repérage de l'évolution des eaux sulfureuses.

Depuis très longtemps les eaux minérales sont soumises à un certain nombre d'analyses chimiques, nous n'avons retenu que le dosage des éléments dont la concentration varie en fonction de l'altération de ces eaux sulfureuses.

La mesure de la sulfuration pratiquée depuis longtemps de façon classique retiendra tout d'abord notre attention : elle repose sur le fait que acide sulfhydrique et sulfures sont des corps réducteurs facilement oxydés par l'iode en présence d'eau, mais la méthode iodométrique donne plutôt le pouvoir réducteur global de l'eau sulfureuse que la teneur en hydrogène sulfuré exacte à cause de l'action oxydante de l'iode sur les hyposulfites et les sulfites.

Nous avons pensé utiliser la très ingénieuse réaction colorée de Caro, mise au point par F. RIMATTEI et Th. ANDREI (18 et 18 bis) mais nous n'avons pu nous procurer les composés chimiques nécessaires à son application.

On a dit à juste raison que l'analyse chimique ne permettait que d'étudier un cadavre ; laissant de côté le dosage d'autres éléments moins intéressants nous n'avons retenu au point de vue chimique que la mesure du pouvoir réducteur de l'eau sulfureuse vis-à-vis de l'iode ; mais nous avons trouvé au Laboratoire d'Hydrologie de la Faculté de Médecine de Marseille des techniques originales pour suivre l'évolution des eaux minérales par des méthodes très sensibles dont le principe repose sur la mesure de très faibles différences de potentiel électrique existant entre une électrode déterminée et l'eau à étudier. Nous rendrons compte également de méthodes reposant sur l'étude de la lumière diffusée par cette eau bien que nos conditions expérimentales ne nous aient pas permis d'en tirer des conclusions fermes sur l'évolution de l'eau sulfureuse.

La nécessité où l'on est, pour trouver un test pratique de la bonne conservation de l'eau sulfureuse, de s'adresser à des méthodes particulières concernant l'état physique de cette eau est mise en évidence par le fait suivant :

Par temps d'orage les médecins traitants à Uriage sont obligés de réduire les doses d'eau minérale injectée pour éviter à leurs clients un choc colloïdoclasiqne désagréable ou dangereux. Cette observation clinique nous fait penser à un changement de constitution de l'eau sulfureuse par temps orageux et en particulier à une modification de l'état du soufre existant dans cette eau ; nous avons effectué des titrages iodométriques alors que l'orage sillonnait le ciel d'éclairs et nous n'avons pas pu par ce moyen déceler une modification dans la constitution chimique de l'eau.

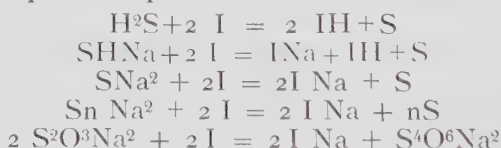
Toutefois, en examinant les jours d'orages l'eau d'Uriage dans certaines conditions (forte épaisseur, éclairage latéral) elle apparaît avec un reflet bleuâtre dû à l'apparition de soufre colloïdal provoquée vraisemblablement par une variation importante de l'état d'ionisation de l'air. Ceci est donc une preuve que l'analyse chimique seule ne permet pas de révéler toutes les différences de constitution de l'eau minérale qui pourtant produisent des réactions vives lors de l'injection au malade.

Nous préciserons maintenant les techniques que nous avons utilisées.

1°) Dosage iodométrique du pouvoir réducteur (Sulfuration).

Nous avons déjà parlé de cette méthode en résumant les travaux de MM. RIMATTEI et PETIT.

Voici les équations qui traduisent les réactions utilisées :



La première méthode reposant sur ces réactions a été préconisée par DUPASQUIER ⁽¹⁹⁾ en 1840 qui définissait un degré sulfhydrométrique avec des solutions un peu arbitraires.

Nous avons utilisé les solutions d'iode N/100 couramment employées en volumétrie. Il est à remarquer que ce dosage n'est pas si simple qu'il paraîtrait à première vue : il s'agit en effet dans le cas de l'eau d'Uriage d'une solution faible d'hydrogène sulfuré à évolution rapide en présence d'air, c'est pourquoi nous avons rejeté les méthodes qui fournissent une analyse plus complète (répartition

du Soufre en H^2S , sulfures sulphydrates, polysulfures et hyposulfures) mais qui nécessitent des manipulations chimiques assez longues, peu commodes et peu utiles pour l'étude entreprise.

A une certaine quantité d'iode N/100, on ajoute une quantité déterminée d'eau sulfureuse, on titre ensuite l'iode en excès par une solution d'hyposulfite N/100 en présence d'empois d'amidon comme indicateur. Étant donné les faibles quantités d'iode mises en œuvre nous avons utilisé au lieu de l'empois d'amidon ordinaire, le réactif de TROMSDORF plus sensible. Nous avons exprimé nos résultats en cm^3 d'iode N/10 correspondant à l'hydrogène sulfuré contenu dans un litre d'eau d'Uriage.

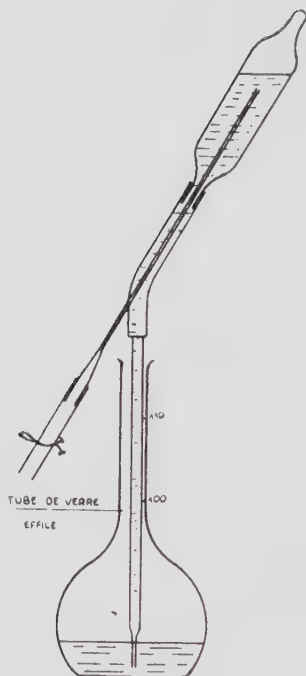
Pour effectuer ce dosage totalement à l'abri de l'air, nous avons mis au point une technique particulière, deux cas sont à envisager :

a) *Cas de l'eau minérale arrivant par la canalisation* : le robinet d'arrivée d'eau minérale est relié à un tube de caoutchouc prolongé par un tube de verre effilé de 20 $\frac{\%}{m}$ environ. On place dans une fiole jaugée de 110 cm^3 , 10 cm^3 d'iode N/100, on enfonce le tube de verre dans la fiole jaugée de façon à ce que la pointe plonge dans la solution d'iode, on ouvre le robinet de façon à faire arriver l'eau lentement jusqu'au trait de jauge ; après avoir agité la fiole, on transvase son contenu dans un erlenmeyer, on rince la fiole jaugée avec dix cm^3 d'eau distillée, on ajoute 2 cm^3 de solution normale d'acide sulfurique et après avoir ajouté un cm^3 de réactif de TROMSDORF, on titre l'excès de la solution d'iode par l'hyposulfite N/100.

b) *Cas des ampoules* : Ce cas présente plus de difficultés et à nécessité un petit appareillage dont nous donnons le schéma. Le tube effilé dont il a été question est adapté à un tube de caoutchouc de quelques cm de long percé latéralement d'un petit trou par lequel passe de bas en haut une aiguille obtenue en étirant un tube de verre, cette aiguille creuse sort du tube de caoutchouc par la partie supérieure de ce tube et est relié à une source d'azote dont on peut aisément régler le débit. Après avoir ouvert une ampoule à une extrémité on introduit l'aiguille dans l'ampoule et on enfle la pointe ouverte dans l'extrémité du tube de caoutchouc (voir croquis).

En faisant arriver l'azote par l'aiguille de verre, il est possible de vider l'ampoule sans que l'eau minérale soit en contact avec l'air, la pointe du tube de verre trempant dans la solution d'iode on opère de façon analogue à celle décrite dans le premier cas. Le même dispositif est employé pour l'étude électrique de l'eau contenue dans les ampoules sans mettre cette eau en contact avec l'air.

Nos dosages ont porté chaque fois sur 100 cm^3 d'eau minérale nécessitant l'emploi de 5 ampoules de 20 cm^3 .



Dispositif utilisé pour le dosage iodométrique des ampoules d'eau d'Uriage

Ces mêmes dosages fait sans précautions spéciales font apparaître une erreur par défaut de 10 à 15 % par rapport aux résultats obtenus à l'aide de ce mode opératoire.

2°) Mesure du Potentiel de Platine :

Pour ces mesures ne disposant pas à Uriage du matériel nécessaire, nous nous sommes rendu à Marseille au Laboratoire d'hydrologie de la Faculté de Médecine et nous remercions Monsieur le Professeur RIMATTEI et son assistant Jean PASTOR de l'accueil bienveillant qui nous a été réservé.

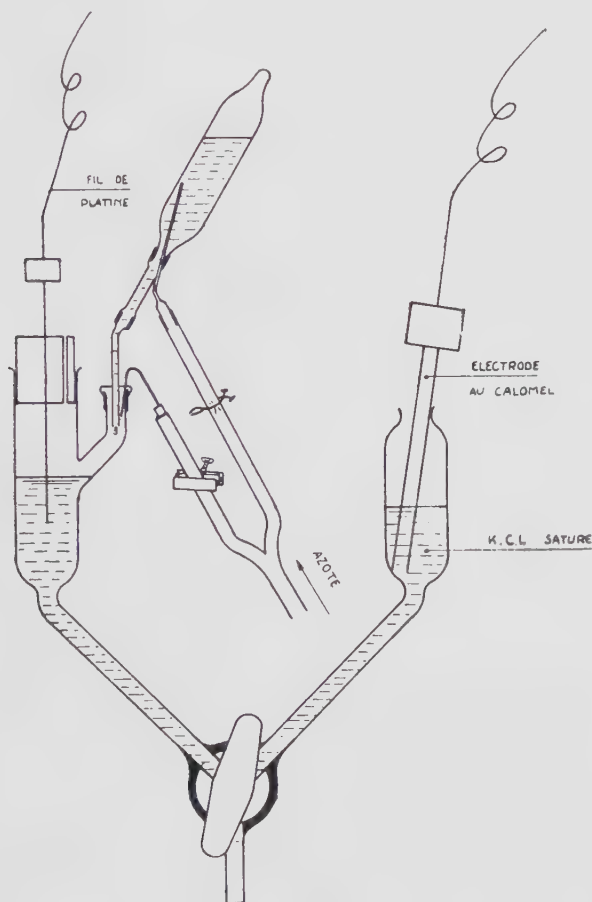
Il s'agissait de mesurer la différence de potentiel qui existe entre un fil de platine plongeant dans l'eau d'Uriage et l'eau d'Uriage. On joint le système fil de platine eau d'Uriage à un voltmètre amplificateur, l'autre borne du voltmètre est reliée à l'électrode d'un élément au Calomel saturé, cet élément étant électriquement en communication avec le liquide étudié par une liaison constituée par une solution de chlorure de potassium saturée.

Le voltmètre amplificateur utilisé présente les avantages suivants :

Sa sensibilité est très grande (2 millivolts).

Il n'absorbe pas de courant, la différence de potentiel à mesurer agit sur la grille d'une lampe à trois électrodes et fait varier le courant débité par cette lampe. C'est de la mesure de l'intensité de ce courant qu'on déduit effectivement la valeur de la différence de potentiel appliquée.

Comme dans le cas du dosage iodométrique, il a fallu prendre des précautions spéciales pour effectuer ces mesures à l'abri de l'oxygène de l'air et nous avons dû réaliser un dispositif particulier pour permettre le rinçage et le remplissage de la cuve de mesure à l'aide du contenu d'une seule ampoule de 20 cm³.



Dispositif utilisé pour les mesures électriques avec le pHmètre Jouan.

Schéma de la cuve d'expérience avec le système de remplissage et de circulation d'azote.

La cuve de mesure possède deux branches réunies par un robinet en verre rodé à double voie ; dans la branche de droite, on introduit une solution saturée de chlorure de potassium et on y fait plonger l'électrode spéciale au calomel, dans l'autre branche l'eau d'Uriage dans laquelle plonge l'électrode de platine ; celle-ci est constituée par un fil de platine bien poli supporté par le bouchon de liège qui obture imparfaitement le récipient ; cette branche porte en outre un ajutage latéral terminé en entonnoir par lequel on introduit le liquide à étudier. Nous y avons adapté un système analogue à celui précédemment décrit pour le vidage des ampoules lors du dosage iodométrique comportant un petit tube de caoutchouc et une aiguille de verre creuse latéralement, le vidage de l'ampoule est commandé par une pince placée sur le tube d'arrivée d'azote. Par une aiguille métallique débouchant également dans cet ajutage latéral arrive de façon continue un courant d'azote purifié qui entretient une atmosphère inerte au-dessus du liquide en expérience (voir figure). Le robinet de verre rodé permet de vider l'une ou l'autre branche de la cuve et il permet d'établir une liaison électrique entre les deux solutions sans mélanger les liquides.

Pour chaque mesure on a attendu la stabilisation du potentiel qui était obtenue en 10 à 15 minutes.

3°) *Mesure du pH.*

Le pH est le cologarithme de la concentration en ions H d'une solution. A Uriage, nous avons utilisé pour cette mesure une solution de bleu de bromothymol et une gamme de référence de la maison Prolabo. La précision obtenue est comparable à celle de l'appareil de la maison Hellige, utilisé par MM. RIMATTEI et PETIT au griffon des sources, mais ne saurait dépasser 0,1 pH dans les meilleures conditions. Dans certains cas, la coloration obtenue est influencée par ce que l'on appelle « l'effet de sel » (concentration déterminée en certains ions de la solution étudiée).

A Marseille, nous nous sommes servi du potentio-ph-mètre de la maison Jouan que nous avons utilisé également comme voltmètre amplificateur. Le procédé électrique est basé sur l'existence d'une différence de potentiel entre une électrode plongeant dans un liquide et ce liquide, pour certaines électrodes ce potentiel est uniquement fonction du pH de la solution. Etant donnée la constitution de notre Phmètre, nous avons utilisé une électrode de verre, le montage est le même que celui que nous avons utilisé pour la mesure du potentiel de platine ; on remplace simplement le fil de platine par l'électrode de verre. Après tarage de l'électrode à l'aide d'une solution tampon étalon, la lecture se fait directement sur l'appareil.

4°) Calcul du Potentiel d'oxydo-réduction (rH).

Nous avons déjà signalé la relation qui existe entre pH, rH, Potentiel de Pt ; plus exactement le rH se calcule à partir des valeurs obtenues pour le pH et le Potentiel de platine.

Comme le pH exprime l'acidité actuelle d'une solution par opposition à l'acidité potentielle donnée par l'analyse volumétrique, M. CLARK a essayé d'exprimer d'une façon analogue l'intensité actuelle du pouvoir réducteur d'un système pour compléter les renseignements fournis par les différentes méthodes de mesure du pouvoir réducteur basés sur les réactions chimiques d'oxydation ; il a proposé de désigner par le symbole rH, le logarithme de l'inverse de la pression d'hydrogène qui s'exerce sur un système oxydo-réducteur (Réaction réversible).

Le rH se détermine en constituant une pile au moyen d'une électrode de platine poli et d'une électrode de référence qui est en principe une électrode à hydrogène, on réunit les liquides des deux électrodes par un pont de jonction et on mesure la différence de potentiel aux bornes de l'élément ainsi constitué.

Nous avons utilisé comme électrode de référence une électrode au calomel d'un usage plus commode et l'on voit ainsi que cette mesure se confond avec celle de la mesure du potentiel de platine telle que nous l'avons déjà défini (dans les calculs il faut faire intervenir la différence de niveau électrique qui existe entre l'hydrogène de l'électrode normale et le calomel).

Le rH se calcule d'après la formule :

$$rH = \frac{Eh + 0,058 \text{ pH}}{0,029}$$

Eh est la somme algébrique du potentiel de platine et du potentiel de la pile au calomel qui est égal à + 250 millivolts.

Quelle signification donner aux valeurs de rH ainsi exprimées ?

Plus la valeur absolue de rH sera faible plus l'intensité du pouvoir réducteur sera grande ; quand le rH augmente en valeur absolue l'intensité du pouvoir réducteur diminue pour s'annuler pour une valeur de rH égal à 27.3 ; les valeurs supérieures à cette limite indiquent que le système est oxydant.

5° Conductivité :

Nous avons mesuré la conductivité de l'eau des ampoules par la méthode classique que nous avons déjà exposée en présentant les travaux de MM. RIMATTEI et PETIT ; nous avons utilisé un

ohmmètre de Chauvin ARNOUX alimenté par un buzzer de TINSLEY et une des cuves spéciales du Professeur RIMATTEI utilisée pour la mesure de la conductivité des sérums et dont la constante est 3,76 ; la température du liquide en expérience est réglée à 18° par immersion dans un thermostat de la cuve de mesure. Ce dispositif fournit des valeurs de la conductivité avec une erreur relative inférieure à $\frac{1}{200}$

Nous donnerons les chiffres que nous avons trouvés car on a ainsi rapidement des renseignements sur les variations importantes qui pourraient se produire accidentellement dans la minéralisation de l'eau minérale ; d'ailleurs pour le cas d'Uriage, conservée en ampoules pendant de nombreuses années, il y a des modifications notables de la conductivité électrique de l'eau sulfureuse ⁽¹⁹⁾.

Voici donc les principaux tests physico-chimiques utilisés par nous pour suivre l'évolution de l'eau sulfureuse d'Uriage conservée en ampoules scellées à la lampe. La méthode classique de dosage iodométrique de la sulfuration étant complétée par des méthodes électriques sensibles qui atteignent les propriétés de l'eau minérale dont semble dépendre l'activité thérapeutique. Nous avons pensé utiliser l'indice de nutrition du Professeur PECH mais les mesures utilisées étant au moins aussi sensibles et ne faisant pas intervenir un organisme humain, nous n'avons pas donné suite à cette intention. Nous avons voulu également faire l'analyse optique du soufre, contenu dans l'eau d'Uriage, pendant son évolution dans nos ampoules, en mesurant à l'aide du photomètre de Pulfrich la lumière diffusée par l'eau sulfureuse ; mais des difficultés techniques (défaut d'homogénéité de la paroi des ampoules) ne nous ont pas permis de mettre notre projet à exécution.

RESULTATS OBTENUS

a) MESURES CHIMIQUES PERSONNELLES

FAITES A URIAGE :

Avec le matériel dont nous disposions à Uriage, nous avons fait quelques mesures de pouvoir réducteur principalement à l'aide de la solution titrée d'iode mais également à l'aide d'autres agents oxydants tels que le permanganate de potasse N/10 en milieu sulfurique et l'eau oxygénée.

Nous n'avons pas retenu les résultats que nous avons obtenus par ces deux dernières méthodes ; le permanganate N/10 en milieu sulfurique est un agent beaucoup trop actif car il est capable d'oxyder le soufre colloïdal et également la matière organique contenue dans l'eau, c'est pourquoi cette méthode ne semble pas commode pour déceler les variations du pouvoir réducteur de l'eau d'Uriage. L'oxydation par l'eau oxygénée paraissait plus intéressante, mais cette oxydation était lente et il fallait la laisser se poursuivre un certain nombre d'heures à l'étuve à 37° ; nous n'avons jamais obtenu par cette méthode des résultats identiques se rapportant à deux échantillons d'eau minérale prélevés au même moment, nous avons pensé que le soufre colloïdal qui apparaît au cours de la première phase de l'expérience joue le rôle de catalyseur dans la décomposition de H_2O_2 en H_2O et O_2 .

Les résultats les plus intéressants se rapportent à des mesures de sulfuration effectuée selon le mode opératoire et avec l'appareillage que nous avons décrit précédemment.

Notre but étant de comparer l'évolution de l'eau sulfureuse d'Uriage en fonction des différents agent d'altération, que nous avons signalés dans notre étude théorique, nos examens ont porté :

Sur l'eau telle qu'elle coule au laboratoire ce qui nous donne les chiffres de base.

Sur le contenu des ampoules remplies et conservées dans les conditions suivantes :

Premier lot. — Ampoules de 20^{cc} remplies sans précautions, c'est-à-dire comportant une bulle d'air de 2^{cc} environ et non stérilisées (Facteurs d'altération : air contenu dans l'ampoule et êtres vivants).

Deuxième lot. — Ampoules identiques mais stérilisées par tyndallisation (Facteur d'altération : air).

Troisième lot. — Ampoules de 20^{cc} remplies à l'abri de l'air bulle gazeuse de l'ampoule : azote ; non stérilisées (Facteur d'altération : êtres vivants).

Quatrième lot. — Ampoules identiques à celles du troisième lot mais tyndallisées.

Pour simplifier nous avons désigné ainsi ces différents lots.

Premier lot : Ampoules sous air non tyndallisées ;

Deuxième lot : Ampoules sous air tyndallisées ;

Troisième lot : Ampoules sous azote non tyndallisées ;

Quatrième lot : Ampoules sous azote tyndallisées.

Pour une même expérience la mise en ampoules des différents lots a été effectuée en un intervalle de temps n'excédant pas une heure et nous pouvons considérer que tous les lots sont homogènes ; des quantités suffisantes d'ampoules des différents lots ont été conservées de façon à pouvoir suivre leur évolution par différentes méthodes sur une longue durée.

1^{re} expérience :

Cette expérience doit être considérée comme réalisant une recherche orientante.

Aux quatre lots précédemment décrits nous en avons ajouté un 5^{me} comportant des ampoules remplies sous air et non tyndallisées mais dont la bulle gazeuse était aussi petite que possible (R plus petit que 0,016 ; voir étude théorique page 18).

La sulfuration est exprimée en milligrammes d'H₂S pour 1.000^{cc} d'eau minérale.

Les ampoules ont été confectionnées le 7 octobre 1947 et la sulfuration initiale était 14,8.

<i>Sulfuration le :</i>	14 oct. 1947	26 juin 1948
Ampoules sous air non tyndallisées	2,12	6,27
Ampoules sous air tyndallisées	8,41	9,35
Ampoules sous azote non tyndallisées	13,00	13,8
Ampoules sous azote tyndallisées	14,7	14,8
Ampoules sous air non tyndallisées petite bulle d'air	12,07	13,38

De cette expérience nous avons pu tirer les conclusions suivantes, confirmées par des recherches ultérieures.

1^o) On voit que l'eau sulfureuse se conserve relativement bien

lorsque R (Rapport du volume de la bulle d'air au volume de l'eau) est plus petit que 0,016.

2°) Les ampoules conservant le mieux leur sulfuration initiale sont celles sous azote tyndallisées.

3°) Dans les deux cas (sous air et sous azote) la tyndallisation permet une amélioration de la conservation, et en vase clos sous gaz inerte, cette opération est sans influence sur la sulfuration.

4°) La sulfuration des ampoules sous air non tyndallisées qui avait presque totalement disparue en 8 jours est remontée de façon notable au bout de 9 mois ; laissant soupçonner une régénération.

Comme on le voit nous retrouvons dans cette expérience les mêmes conclusions que celles auxquelles étaient arrivés Monsieur le professeur RIMATTEI et son élève Jean PETIT avec l'eau des Camoins-les-Bains.

2^{me} expérience : Sulfuration, alcalinité, pH colorimétrique de l'eau sulfureuse en ampoules.

Nous avons le 5 novembre 1948 rempli une importante quantité d'ampoules des différents lots ; ces ampoules nous ont servi à faire des mesures de sulfuration à différentes époques et c'est également sur ces lots que nous avons fait les mesures physiques au laboratoire d'Hydrologie de la Faculté de Médecine de Marseille, dont nous parlerons plus loin.

Dans les tableaux qui vont suivre nous trouverons les résultats des mesures des grandeurs suivantes :

Sulfuration : en cm³ d'iode N/10 pour 1.000 cm³ d'eau sulfureuse.

Sulfuration initiale : 8,4

Alcalinité : en cm³ de soude N/10 pour 1.000 cm³

Alcalinité initiale : 37

pH : Obtenu à l'aide du Bleu de bromothymol

PH initial : 6,9

1^{er} lot : Ampoules sous air non tyndallisées.

Dates	Sulfuration	Alcalinité	pH
10 nov. 1948	2,8	34,5	7,00
25 nov. 1948	0,90	34	7,00
27 déc. 1948	1,45	33	6,9
28 janv. 1949	2,4		6,9
28 févr. 1949	2,7		7,00
5 juill. 1949	3,2		7,00
15 déc. 1949	4,5		6,9

2^{me} lot : Ampoules sous air tyndallisées.

	Dates	Sulfuration	Alcalinité	pH
10	nov. 1948	5	34	7,05
25	nov. 1948	4,2	32	7,1
27	déc. 1948	4	32	7,05
28	janv. 1949	4,2		7,00
28	févr. 1949	4,1		7,00
5	juill. 1949	5,4		7,00
15	déc. 1949	4,5		7,00

3^{me} lot : Ampoules sous azote non tyndallisées.

	Dates	Sulfuration	Alcalinité	pH
10	nov. 1948	8,2	37,5	7,00
25	nov. 1948	8,00	37,5	7,00
27	déc. 1948	7,95	37,5	7,00
28	janv. 1949	8,00		7,1
28	fév. 1949	7,9		7,1
5	juill. 1949	7,8		7,1
15	déc. 1949	8,2		7,00

4^{me} lot : Ampoules sous azote tyndallisées.

	Dates	Sulfuration	Alcalinité	pH
10	nov. 1948	8,35	37	7,00
25	nov. 1948	8,15	36	7,00
27	déc. 1948	8,25	36,5	7,00
28	jan. 1949	8,3		7,00
28	fév. 1949	8,4		7,00
5	juill. 1949	8,2		7,00
14	déc. 1949	8,4		7,00

b) AUTRES OBSERVATIONS FAITES A URIAGE

Une simple observation macroscopique permet de déceler une évolution de l'eau minérale contenue dans les ampoules scellées à la lampe.

En effet, dans les ampoules sous air et non tyndallisées, on voit apparaître à la surface en 3 ou 4 jours un voile formé de particules solides qui s'agglomèrent pour former un précipité dans les jours qui suivent. Si on a pris soin de ne pas agiter l'ampoule ce précipité flotte à la surface et on peut le recueillir à l'aide d'une petite spatule après avoir brisé la partie supérieure de l'ampoule ; en chauffant la spatule on perçoit une odeur très nette de SO², le précipité est donc vraisemblablement formé en grande partie de soufre.

Dans les ampoules sous azote et non tyndallisées ce précipité apparaît parfois, mais il est beaucoup moins abondant, se réduisant à 2 ou 3 particules.

Dans les ampoules sous air ou sous azote tyndallisées on ne note jamais la présence d'un semblable précipité.

Au bout de 3 ou 4 mois ce précipité disparaît complètement.

Il est logique de rapprocher ces faits de l'étude bactériologique développée précédemment et plus spécialement des caractères de culture de *Thiobacillus thioparus* et de *Thiobacillus thiooxydans* : le premier pourrait être responsable de l'apparition du précipité de soufre, le second intervenant ultérieurement pour faire passer ce soufre en solution en l'oxydant à l'état de sulfate ; la tyndallisation supprimant toute vie en supprimerait également les effets.

Cette apparition et disparition d'un précipité auxquelles on peut attribuer une origine biologique, comme notre étude théorique nous y autorise est tout à fait en accord avec l'évolution de l'eau minérale que l'analyse chimique nous a révélée.

c) MESURES FAITES AU LABORATOIRE D'HYDROLOGIE DE LA FACULTE DE MARSEILLE

Au laboratoire d'hydrologie de la Faculté de Marseille, nous avons effectué des mesures de :

Potentiel de platine, pH électrique, Conductivité, Sulfuration selon la technique que nous avons déjà exposée.

Ces mesures ont porté sur les ampoules faites à Uriage le 5 novembre 1947 et quelques ampoules remplies sous azote et tyndallisées de fabrication plus ancienne.

Nous n'avons malheureusement pas pu faire ces mesures physico-chimiques le jour du remplissage, mais nous les avons effectuées sur de l'eau transportée en bouteille complètement remplies et prélevées la veille de leur examen (MM. RIMATTEI et PETIT ont montré que l'eau sulfureuse ainsi prélevée conserve l'intégralité de ses propriétés pendant plusieurs mois).

Nous donnerons dans les tableaux qui vont suivre, les valeurs du rH que nous avons calculées à partir des valeurs du potentiel de platine et du pH correspondantes. Le potentiel de platine est exprimé en millivolts et la conductivité en mho cm cm² ; les mesures de sulfuration faites à Marseille diffèrent un peu de celles effectuées à Uriage car elles ont porté seulement sur le contenu d'une ou deux ampoules d'eau sulfureuse conservée.

1^{er} Lot : Ampoules faites sous air et non tyndallysees.

Date	Pot. de Pt	pH	rH	Conductivité	Sulfuration
Mars 1949	— 170	6,8	11,6	$1,45 \cdot 10^{-2}$	1,16
12 Juillet 1949	— 310	6,8	11,5		
16 Décembre 1949	— 323	6,8	11	$1,41 \cdot 10^{-2}$	3,05

2^{me} Lot : Ampoules faites sous air et tyndallysées.

Date	Pot. de Pt	pH	rH	Conductivité	Sulfuration
Mars 1949	— 250	6,8	13,9	$1,45 \cdot 10^{-2}$	2,5
12 Juillet 1949	— 299	6,8	11,8		
16 Décembre 1949	— 245	6,85	13,4	$1,41 \cdot 10^{-2}$	00'8

3^{me} Lot : Ampoules faites sous azote et non tyndallisées

Date	Pot. de Pt	pH	rH	Conductivité	Sulfuration
Mars 1949	— 325	6,85	11,3	$1,45 \cdot 10^{-2}$	6,5
12 Juillet 1949	— 350	6,85	10,2		
16 Décembre 1949	— 340	6,8	10,5	$1,41 \cdot 10^{-2}$	7,5

4^{me} Lot : Ampoules faites sous azote et tyndallisées.

Date	Pot. de Pt	pH	rH	Conductivité	Sulfuration
Mars 1949	— 325	6,85	11,3	$1,45 \cdot 10^{-2}$	6,8
12 Juillet 1949	— 354	6,85	10,1		
16 Décembre 1949	— 342	6,8	10,3	$1,41 \cdot 10^{-2}$	7,6

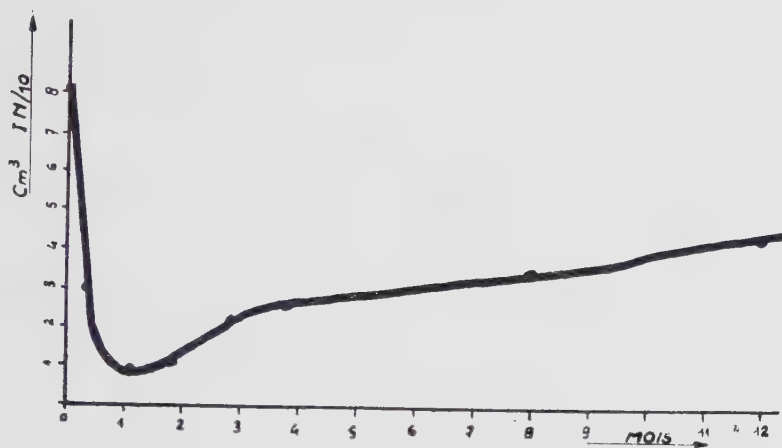
*Eau d'Uriage mise en bouteille le 14 Décembre 1949 à 17 heures
sans bulle d'air, examiné le 16 Décembre 1949*

Date	Pot. de Pt	pH	rH	Conductivité	Sulfuration
	— 340	6,8	10,5	$1,41 \cdot 10^{-2}$	8,1

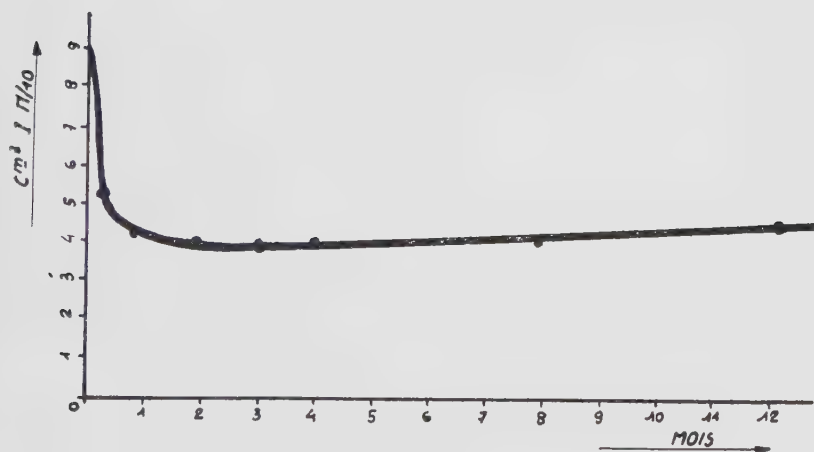
Ampoules faites sous azote et tyndallisées le 22 Août 1947

Date	Pot. de Pt	pH	rH	Conductivité	Sulfuration
16 Décembre	— 335	6,8	10,6	$1,39 \cdot 10^{-2}$	7,6

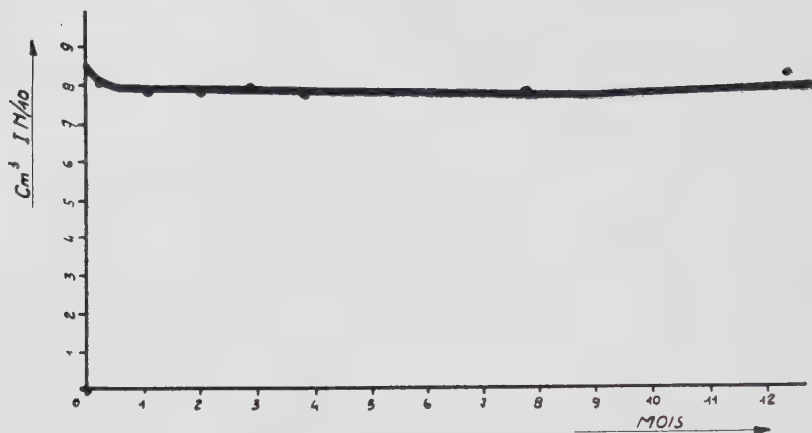
Variation de la sulfuration de l'eau d'Uriage conservée en ampoules scellées



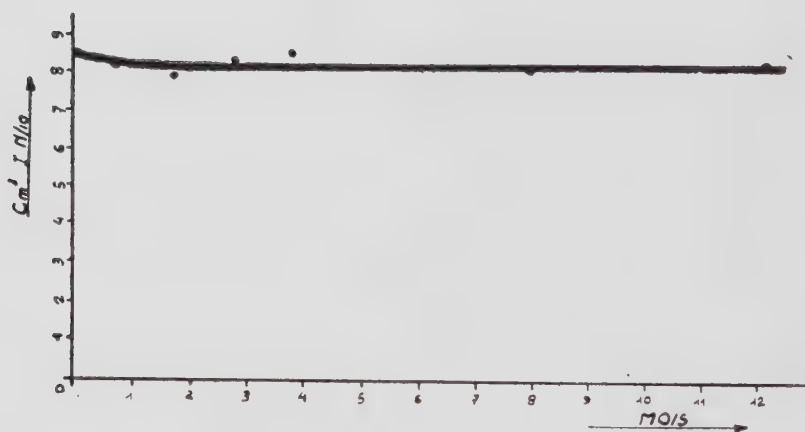
Ampoules non tyndallisées conservées avec bulle d'air.



Ampoules tyndallisées conservées avec bulle d'air.



Ampoules non tyndallisées conservées avec azote.



Ampoules tyndallisées conservées avec azote.

CONCLUSION

Relations existant entre les facteurs physico-chimiques et les facteurs biologiques de l'évolution des eaux sulfureuses

Les résultats des mesures physico-chimiques faites en mai 1949 au Laboratoire d'Hydrologie de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Marseille ont fait l'objet d'une communication à l'Académie de Médecine de MM. le Professeur RIMATEI, Jean PASTOR et nous-mêmes (20) présentée par Monsieur le Professeur LOEPER le 17 mai 1949 et dans laquelle nous énoncions l'essentiel des conclusions qui vont suivre; nous remarquerons que les expériences ultérieures, comme il résulte de l'examen des tableaux que nous venons de présenter, n'ont fait que confirmer ces premiers résultats.

Après un an de conservation l'eau sulfureuse d'Uriage s'altère moins en ampoules remplies sous azote qu'en ampoules remplies sous air et quel que soit le traitement ultérieur subi par ces ampoules; en effet le rH est plus faible (10,5 et 10,3 au lieu de 11 et 13,4), la sulfuration est plus élevée (7,5 et 7,6 au lieu de 3,05 et 3,00. La tyndallisation améliore un peu la conservation; après un mois de conservation, sulfuration réduite à 4,2 au lieu de 0,95 pour les ampoules sous air et non tyndallisées; pour les ampoules sous azote après un an pH et rH sont inchangés mais la sulfuration est légèrement supérieure pour les ampoules tyndallisées (7,6 au lieu de 7,5).

L'étude de l'évolution des ampoules faites sous air et non tyndallisées montre un phénomène intéressant qui apparaît nettement en examinant la courbe de la variation de la sulfuration en fonction du temps. Ces ampoules présentent une régénération du pouvoir réducteur au bout de quelques mois, la sulfuration qui au bout de un mois s'était abaissée à 0,95 est remontée à 3,2 au bout de 8 mois et à 4,5 au bout de 13 mois; parallèlement le rH qui était de 16,6 après quatre mois de conservation s'est abaissé à 11 après 13 mois.

La discussion de ces expériences est assez délicate; il est toutefois certains faits qui sont bien établis. Pour les systèmes que nous avons étudiés on peut signaler deux facteurs de l'évolution des Eaux sulfureuses conservées en ampoules ou en flacons bouchés.

Un facteur chimique, la concentration en oxygène du gaz existant dans l'ampoule; l'oxydation, la dégradation de l'eau sul-

fureuse étant d'autant plus rapide et plus complète que la concentration en oxygène est plus grande (loi d'action de masse) ; l'influence de ce facteur ayant déjà été mise en évidence par Monsieur le Professeur RIMATEI et Jean PETIT lors de leur étude de l'évolution de l'eau sulfureuse des Camoins-les-Bains notre étude apporte une confirmation à leurs travaux.

Un facteur biologique : action adjuvante des microbes oxydants lorsque la concentration en oxygène est suffisante mais cette action qui est supprimée par la tyndallisation paraît moins importante que l'action chimique proprement dite.

Cette action biologique des microbes dont nous avons démontré l'existence permet à notre avis d'expliquer le processus de régénération qui se manifeste dans des ampoules faites sous air et non tyndallisées. Après une première phase de l'évolution au cours de laquelle la concentration en oxygène est telle que seule se manifeste l'action des microbes oxydants (Beggiatoa, T. Thioparus, T. Thiooxydans) qui concurremment avec l'action directe de l'oxygène aboutit à l'oxydation presque complète de l'Hydrogène sulfuré en SO_4H_2 , les conditions physico-chimiques se trouvant modifiées par la baisse de la concentration en oxygène c'est l'activité des Sulfato-réducteurs anaérobies qui devient prépondérante, ceux-ci régénérant le pouvoir réducteur disparu ; une confirmation de cette hypothèse se trouve dans le fait que dans les ampoules sous air et non tyndallisées cette régénération n'est pas sensible.

On a bien des exemples de réactions chimiques réversibles, mais dans ce cas la régénération se produirait également dans les ampoules sous air et tyndallisées.

Il ne semble pas que ce processus de régénération soit suffisant pour que l'eau sulfureuse retrouve la totalité de son pouvoir réducteur initial ; dans une ampoule scellée dont le contenu a déjà subi des modifications importantes, les conditions physico-chimiques sont loin d'être les mêmes que celles qui existent dans l'eau minérale avant de sourdre au griffon ; il faut rappeler en effet que l'activité relative des microbes réducteurs et oxydants est en dépendance étroite avec les conditions physico-chimiques du milieu dans lequel ils évoluent.

Comme conclusion pratique à notre étude, nous retiendrons le fait que l'eau sulfureuse d'Uriage conserve ses propriétés physico-chimiques presque intactes en ampoules même après deux ans de conservation quand elle est maintenue en ampoules scellées et en atmosphère d'azote.

Application des résultats de l'Étude Théorique et Expérimentale :

Parallèlement à nos recherches théoriques, nous avons poursuivi, au cours de ces dernières années passées au Laboratoire des Eaux d'Uriage, l'étude et la réalisation d'un matériel de mise en ampoules de l'eau sulfureuse capable d'assurer une production suffisante de ces ampoules et permettre un début d'exploitation commerciale.

Nos premières recherches confirmées par des expériences ultérieures nous avaient donné les conditions physico-chimiques de la technique à utiliser : préserver l'eau sulfureuse de tout contact avec l'air, conservation de l'eau en atmosphère d'azote, stérilisation.

La captation et l'amenée d'eau au laboratoire étant à la charge de l'Etablissement Thermal d'Uriage ; nous ne pouvions utiliser que l'eau qui nous était fournie par contrat, toutefois nous devons reconnaître que le système de canalisations utilisé offre des garanties suffisantes pour assurer un transport correct du griffon au Laboratoire sans que l'eau soit altérée par oxydation dans le trajet griffon-laboratoire de mise en ampoules.

P. URBAIN (22) donne une description et le schéma de la captation de la source sulfureuse d'Uriage. Le griffon se trouve au fond d'un puit circulaire de 1 m. 50 de diamètre et 6 m. 50 de profondeur qui se trouve à l'extrémité d'une galerie de plusieurs centaines de mètres creusée dans la montagne. Du fond de ce puits part une canalisation de plomb de 10 cm. de diamètre ; cette canalisation remonte pour former un siphon qui s'amorce quand le puit est plein. Sur cette canalisation principale est branchée avant toutes les canalisations de l'Etablissement Thermal, la canalisation du Laboratoire. De par ce système il ne peut y avoir de prise d'air importante car le siphon se désamorcerait ; malheureusement les canalisations ne sont pas toujours visibles et sont souvent enfouies dans la maçonnerie ou de la terre, de sorte qu'il est difficile de déceler une petite ouverture rendant possible une aspiration d'air (Phénomène de Venturi). Ceci démontre la nécessité qu'il y a à surveiller, par des analyses chimiques répétées, la constance des propriétés de l'eau minérale pour rechercher une avarie éventuelle

dans les conduites et y porter remède rapidement. Il nous a fallu trouver un système de remplissage des ampoules à l'abri de l'air. Il fallait aussi que la bulle gazeuse restant dans l'ampoule et nécessaire pour permettre la soudure soit uniquement formée par un gaz inerte, nous avons choisi pour des raisons de commodité l'azote.

Après avoir décelé la présence dans l'eau d'Uriage de micro-organismes capables d'oxyder l'hydrogène sulfuré, tout procédé de stabilisation devait donc tendre soit à paralyser l'action des Sulfuraires soit à les détruire.

Les précautions prises pour mettre l'Eau d'Uriage totalement à l'abri de l'air entravent et même annulent l'activité des Thiobacilles, ces derniers sont, en effet, aérobies stricts.

Toutefois, l'Eau présentant parfois des souillures microbiennes il est nécessaire de stériliser les ampoules d'Eau d'Uriage. On évite, ainsi, par surcroît le développement d'un processus biologique de dégradation de l'hydrogène sulfuré.

Les procédés de stérilisation utilisés doivent être suffisamment efficaces mais ne doivent pas altérer les propriétés physico-chimiques de l'Eau. Le premier procédé auquel on pense, dans ce cas, est la filtration sur bougie. Nous avons essayé ce système en le réalisant de façon à éliminer toutes causes d'oxydation. La bougie était, dans ce but, montée à l'inverse de la façon courante, l'orifice étant dirigé vers le haut. L'arrivée d'eau se faisait par l'extérieur dans une enceinte privée de toute trace d'air. Après un fonctionnement de plusieurs heures, destiné à rincer tout le dispositif, nous avons procédé à des dosages d'hydrogène sulfuré avant et après filtration.

Nous avons trouvé, avant filtration, 14,02 milligrammes d'H₂S pour 0/00 et, après filtration, 13,85, ce qui dénote une très légère adsorption de H₂S par la porcelaine. Mais il y a plus grave : des ampoules remplies avec les précautions désirables pour éviter toutes autres causes d'altération, ont évolué de façon nette et force nous est bien de penser que Thiobacillus Thioparus étant très petit (0,3 μ à 0,6 μ) traverse les filtres.

Laissant de côté les systèmes de stérilisation par les rayons ultra violet simples à utiliser mais dont l'action sur les propriétés de l'Eau d'Uriage nous est inconnue, nous nous sommes tournés vers les systèmes classiques de stérilisation.

Nous avons réalisé quelques expériences à l'autoclave qui nous ont donné de bons résultats au point de vue de la stabilité des ampoules obtenues, mais nous avons plus spécialement étudié et

appliqué la tyndallisation qui est la façon la moins brutale d'utiliser la chaleur.

TYNDALL (1882) avait contesté qu'une culture bactérienne chauffée trois jours consécutifs à une température de $+100^{\circ}$, pendant une minute chaque fois devenait stérile. Il admettait que les spores se développaient entre chaque chauffage et étaient détruites par le chauffage postérieur ; ou bien, encore, que les enveloppes des spores modifiées par le premier chauffage étaient détruites par le second et le troisième.

DUCLAUX réfute ces explications et admet que la première action de la chaleur a pour effet de gonfler la spore, d'y faire pénétrer une petite quantité d'eau et de rendre le protoplasme de la spore plus coagulable. Le second chauffage accentue encore cette vulnérabilité et le troisième amène la mort définitive de la spore. De nos jours, on admet que les alternatives de chaud et de froid auxquelles on soumet les spores les rendent de plus en plus fragiles et finissent par les tuer.

La Tyndalisation peut s'opérer à 100° , mais elle se pratique généralement au-dessous de cette température en prolongeant l'action de la chaleur. On opère à 70° en maintenant cette température pendant une heure, on renouvelle cette opération trois jours de suite.

On a vu dans l'étude théorique (Travaux de F. RIMATTEI et J. PETIT) que le chauffage à l'abri de l'air jusqu'à 70° , n'altère pas l'eau sulfureuse.

Cette méthode de stérilisation qui est utilisée de la façon la plus courante, altère le moins possible les qualités des solutés.

Toutefois, la vitesse des réactions étant accélérée par la température, la nécessité d'une atmosphère d'azote aussi pure que possible s'impose, pour éviter les phénomènes d'oxydation. L'efficacité de la tyndalisation qui a été contrôlée de nombreuses fois, s'avère satisfaisante en général.

Nos êtres vivants étant des organismes éminemment fragiles doivent y être suffisamment sensibles. Il n'y a que dans le cas du sulfato-réducteur qu'un doute subsiste ; en effet, certaines espèces de ces genres d'organismes peuvent subir des températures relativement élevées. (*Vibrio thermo-desulfuricans*, découvert par ELION et retrouvé aux Etats-Unis par SMITH et THOMPSON) et dont l'optimum de température est aux environs de 55° et qui peut très bien vivre à 65°). Il est à remarquer que l'activité des sulfato-réducteur est producteur et non destructeur de pouvoir réducteur (SH^2).

REALISATION PRATIQUE ET APPAREILLAGE UTILISE

Les principes d'une bonne conservation de l'eau sulfureuse d'Uriage étaient connus, nous les avons appliqués à la réalisation de dispositifs industriels permettant une mise en ampoule de l'Eau d'Uriage garantissant une bonne conservation de cette eau minérale.

Dans le commerce, il est impossible de trouver une machine réalisant de façon satisfaisante la conservation des liquides en atmosphère d'azote. Le premier système qui a été utilisé était très simple : au moyen d'une longue aiguille par laquelle arrivait l'azote, les ampoules étaient vidées d'air et remplies d'azote par déplacement gazeux ; les ampoules étaient ensuite remplies d'eau à l'aiguille jusqu'au niveau convenable, puis soudées à la main. En plus du débit qui était nettement insuffisant (180 ampoules à l'heure pour deux ouvrières) ce procédé avait deux inconvénients : on n'était jamais certain que tout l'air avait été chassé de l'ampoule ; il se produisait un brassage de l'air plutôt que son évacuation ; il s'écoulait ensuite un temps assez long entre remplissage et soudure rendant possible la diffusion de l'azote dans l'atmosphère.

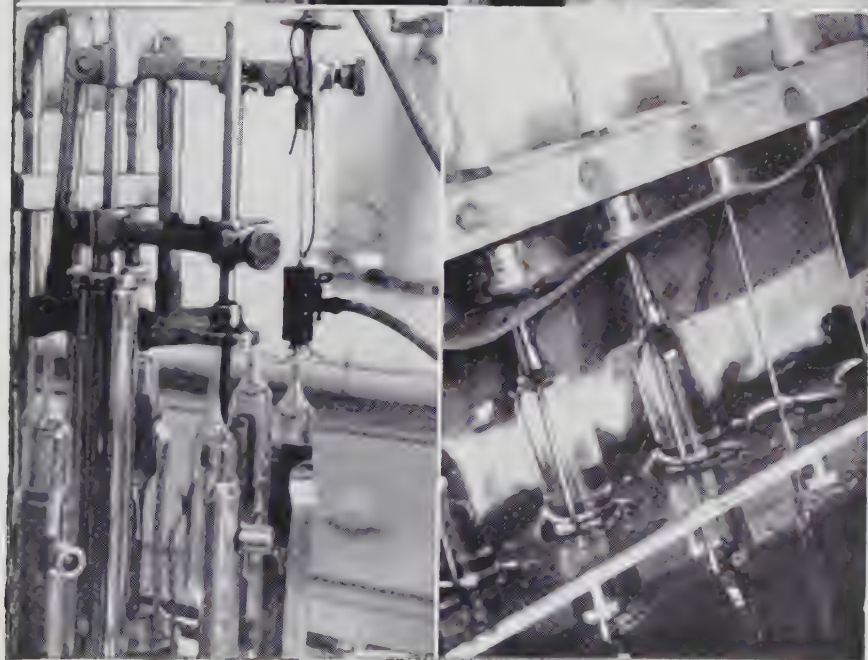
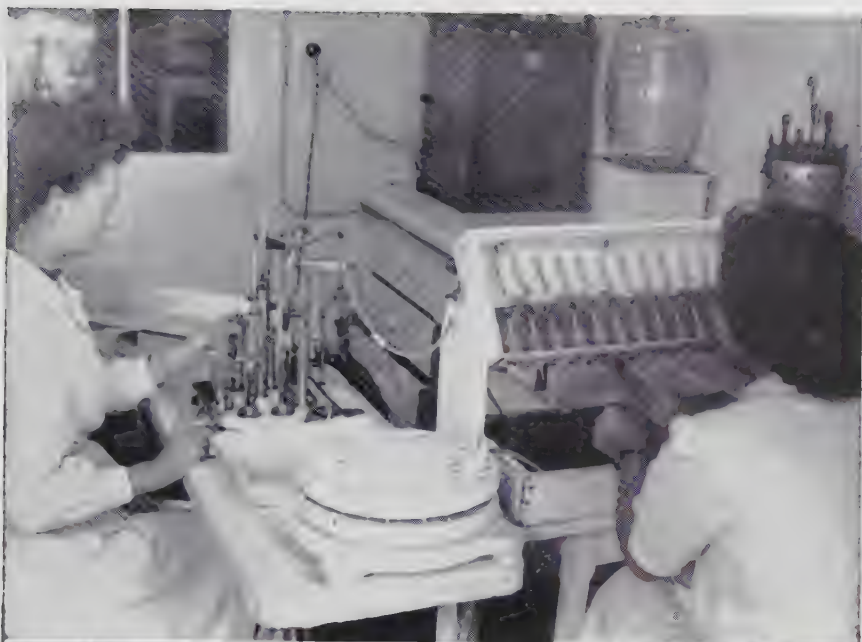
Pour éviter l'inconvénient du brassage de l'air par l'azote une machine très compliquée avait été construite, elle devait effectuer le remplissage des ampoules en trois temps :

- 1°) Création du vide dans l'ampoule ;
- 2°) Remplissage par de l'azote ;
- 3°) Introduction dans l'ampoule de la quantité d'eau voulue.

Ceci avec une cadence prévue de 1.000 ampoules à l'heure, la complexité de ce matériel qui avait donné paraît-il chez le constructeur des résultats satisfaisants, ne nous a pas permis de remplir à Uriage seulement une demi-douzaine d'ampoules, nous avons donc dû mettre au point un matériel plus simple et plus robuste.

Nous avons à notre disposition le système par déplacement d'air par l'azote et aussi une machine à souder MEYER, pour cela nous avons modifié les chalumeaux servant à la soudure en ajoutant sur le mélangeur butane air un robinet d'arrivée d'oxygène, les chalumeaux alimentés ainsi au mélange butane, air, oxygène, fonctionnent parfaitement et la machine peut souder 1.200 à 1.500 ampoules à l'heure.

Pour remplir des ampoules, la façon la plus simple d'opérer est d'utiliser le vide, par un jeu de robinet, il eut été facile de faire arriver l'eau minérale et l'azote au moment opportun, mais nous n'avons pas essayé ce système car il n'était pas indiqué de soumettre brusquement l'eau sulfureuse à une très faible pression



- 1 — Photographie montrant la disposition de l'appareillage.
- 2 — Détail de la rampe de remplissage
- 3 — Système d'injection d'azote, au premier plan jauge de mise à hauteur des ampoules, à l'arrière plan aiguille d'injection d'azote avec son dispositif de centrage.

pouvant occasionner un départ de l'hydrogène sulfuré et surtout un brassage de l'eau sulfureuse.

Il ne nous restait plus qu'à envisager le remplissage à l'aiguille, ce mode opératoire qui tend à se généraliser dans l'industrie pharmaceutique par l'utilisation de remplisseuses automatiques, s'il est plus lent que le remplissage à la cloche à vide offre l'avantage d'être plus propre, les poussières extérieures ne risquent pas de venir en contact avec la solution. Abandonnant le système de remplissage préalable de l'ampoule par l'azote, nous avons préféré remplir nos ampoules totalement par de l'eau sulfureuse renouvelée plusieurs fois pour éliminer celle qui au début de l'opération, a été en contact avec l'air ; la bulle d'azote est créée juste avant la soudure.

Après quelques tâtonnements et de nombreux essais, nous avons finalement adopté la technique que nous allons décrire.

Avant toutes opérations de remplissage, les ampoules, placées dans des caissons métalliques, la pointe ouverte vers le bas, sont stérilisées au poupinel à 180°, pendant 30 minutes. Cet appareil électrique est muni d'un dispositif de régularisation automatique.

Remplissage des ampoules :

L'eau minérale provenant du griffon par une canalisation de plomb arrive à un robinet du laboratoire placé sur l'évier.

A la sortie, l'eau traverse de bas en haut un filtre en verre Pyrex N° 1 en verre frité ; de par la façon dont l'eau arrive dans ce filtre, ce dernier est toujours totalement rempli d'eau sans bulles gazeuses. Ce filtre est nettoyé périodiquement. Puis l'eau redescend et est distribuée, au moyen d'une rampe aux 12 aiguilles de remplissage par lesquelles elle s'écoule de façon continue. A aucun moment, l'eau qui s'écoule par les aiguilles n'a été en contact avec l'air, au cours de son parcours dans cet appareillage. En dehors des heures d'utilisation, l'eau s'écoule de façon continue par un dispositif approprié pour que les canalisations soient toujours remplies et balayées par de l'eau minérale en circulation.

L'ouvrière qui effectue le remplissage fait pénétrer profondément l'aiguille dans l'ampoule. Cette dernière est maintenue en place par un dispositif convenable, sans qu'il soit nécessaire de la tenir à la main. L'ouvrière garnit ainsi toutes les aiguilles, l'eau remplit les ampoules et déborde ; elle retire ensuite les ampoules pleines par groupes de 3 et les remplace aussitôt par des ampoules vides ; pour ces opérations elle utilise successivement les différentes parties de la rampe. Ce dispositif qui permet un débit intéressant

(1.200 à l'heure environ), réalise le remplissage des ampoules de la meilleure façon : l'eau minérale arrive en effet par le fond et chasse tout l'air qui se trouve dans l'ampoule ; l'eau minérale qui a été en contact avec de l'air est à son tour chassée et est remplacée par de l'eau absolument intacte ; comme chaque ampoule reste environ 30 secondes sous l'aiguille, le liquide qui la remplit est renouvelé plusieurs fois, réalisant en plus un rinçage supplémentaire.

Fermeture des ampoules :

Les ampoules totalement pleines sont ensuite passées au poste de soudure à l'aide d'un plateau tournant et sont introduites dans la soudeuse. Nous avons modifié la soudeuse MEYER du commerce, de façon à réaliser la conservation de l'eau en atmosphère d'azote.

Le meilleur moyen que nous avons trouvé pour créer la bulle d'azote a été de l'injecter sous faible pression à l'aide d'une aiguille descendant dans l'ampoule jusqu'au niveau de l'étranglement, l'azote chasse l'eau et la remplace, le col de l'ampoule est exempt de liquide retenu par capillarité, ce qui est une des conditions d'une bonne soudure. Au début nous avons réalisé cette opération manuellement, mais depuis un an nous avons réalisé un dispositif mécanique qui effectue cette injection d'azote sur la machine à souder, juste avant la soudure et de façon automatique ; nous évitons ainsi toute diffusion entre l'air et l'azote.

La machine est du type à plateau revolver à rotation intermittente. Les ampoules sont introduites une à une dans des porte-ampoules. A la deuxième station une jauge se déplaçant de bas en haut, mue par une came, l'ajuste à la hauteur convenable. A la troisième station a lieu l'injection d'azote, l'azote provient de tubes en acier, où il est comprimé à 150 kilogs, à la sortie de ce tube un mano-détenteur permet d'en régler la pression ; après avoir traversé un flacon laveur, l'azote s'écoule de façon continue par une aiguille de 10 cm. de long placée sur la machine, cette aiguille est portée par une tige dont le déplacement vertical est obtenu à l'aide du mouvement de la tige de mise à niveau des ampoules convenablement amplifié. Un petit entonnoir de centrage coulissant sur l'aiguille vient coiffer la pointe ouverte de l'ampoule, l'aiguille pénètre dans l'ampoule, l'azote chasse l'eau en excès puis l'aiguille est remontée.

Ce n'est pas sans difficultés que nous avons pu résoudre les problèmes qui se posaient, en particulier celui du centrage des pointes pour que l'aiguille pénètre sans difficultés dans l'ampoule malgré les irrégularités de fabrication des cols, il a fallu aussi étudier l'évacuation de l'eau sulfureuse en excès de façon à éviter le ruissellement de l'eau sulfureuse sur les pièces métalliques

de la machine, les matières premières ont aussi dû être choisies avec attention à cause de la corrosion. On se reportera aux photographies pour se faire une idée du fonctionnement du dispositif.

A la quatrième station, les ampoules sont soudées au moyen de chalumeaux ; les ampoules sont alors animées d'un mouvement de rotation autour de leur axe, condition indispensable pour éviter les crochets et obtenir une perle complètement hermétique.

L'eau minérale contenue dans l'ampoule n'a jamais été en contact avec l'air, nous avons vu comment cela a été réalisé lors du remplissage. Entre le moment du remplissage et le moment où a lieu l'injection d'azote, l'eau n'est en contact avec l'air que par quelques millimètres carrés représentés par l'ouverture de l'ampoule, et même cette eau qui pourrait être oxydée est rejetée par l'azote. La bulle d'azote se fait de la meilleure façon par remplacement d'eau par ce gaz. Le système automatique d'injection sur la soudeuse juste avant le poste de soudure réduit à néant les pertes par diffusion entre la bulle gazeuse et l'atmosphère.

Stérilisation Finale : Sortant de la soudeuse, les ampoules sont placées sur des portoirs spéciaux pour permettre le refroidissement des pointes, puis introduites dans les paniers du tyndallisateur. L'appareil utilisé est un tyndallisateur électrique Lequeux.

Les ampoules sont chauffées au bain-marie dans cet appareil pendant une heure à 70° opération renouvelée trois fois à 24 heures d'intervalles, le premier chauffage ayant lieu le jour même du remplissage. L'eau du tyndallisateur est colorée à la fluoresceïne.

Opérations de Contrôle : Au cours de l'essuyage des ampoules une à une, les ampoules présentant une fluorescence verte sont éliminées (le plus souvent, ampoules fêlées). Certaines ampoules n'ayant pas d'ouverture visible sont pourtant parfois nettement colorées ce qui montre bien l'efficacité de ce contrôle. Nous avons primitivement utilisé le bleu de méthylène, mais ce dernier corps lorsqu'il se trouvait dans les ampoules en faible proportion était réduit par H_2S en un dérivé incolore ; après plusieurs semaines, lorsque tout H_2S avait diffusé par l'ouverture de l'ampoule, le contenu de cette dernière se colorait en bleu ; le système actuel ne présente pas cet inconvénient.

Des témoins sont choisis parmi les ampoules terminées et sont utilisés à pratiquer des ensemencements sur bouillons gélosés. A ce jour, tous ces examens sont demeurés négatifs.

Des essais sur les milieux spéciaux ont également été faits par Madame WINOGRADSKY avec les ampoules tyndallisées et ont tous été négatifs.

Résultats obtenus :

Grâce à la dextérité de l'ouvrière qui fait le remplissage, la soudeuse peut être alimentée sans temps mort ; le débit moyen horaire est de 1.200 ampoules. Depuis plus d'un an cet appareillage fonctionne sans défaillance et il a permis de remplir les ampoules mises en expérience le 5 Novembre 1948 ; l'examen des résultats des mesures physico-chimiques qui ont été présentées au chapitre précédent montre que pour les ampoules ainsi préparées après un an de conservation, Sulfuration, pH colorimétrique sont identiques à ceux de l'eau d'Uriage le jour du remplissage et que rH, pH électrique sont identiques à ceux d'une eau très récemment prélevée et n'ayant subi aucun traitement.

Il est difficile d'affirmer que la conservation des propriétés physico-chimiques de notre eau sulfureuse en ampoules scellées atteste d'une façon certaine la conservation des propriétés thérapeutiques, ce que seule l'expérience clinique peut démontrer, mais nous avons observé auprès des praticiens une amélioration des résultats cliniques obtenus par l'emploi des ampoules d'eau d'Uriage parallèle à l'amélioration de notre technique de fabrication de ces ampoules ; c'est ainsi que les doses injectées et parfaitement bien tolérées ont été en augmentant pour atteindre facilement 80 cm³ quotidiens.

Ainsi se trouve perfectionnée l'utilisation de l'eau minérale loin du griffon et établi l'utilité d'un repérage physico-chimique de cette eau.

Conclusion Générale

Par ce travail que nous avons pu mener à bien grâce au concours de collaborateurs désintéressés, nous avons apporté une modeste contribution à la question de la conservation des eaux sulfureuses en ampoules scellées pour leur utilisation loin du griffon.

Monsieur le Professeur F. RIMATTEI et son élève Jean PETIT avaient déjà précisé des conditions à réaliser pour résoudre ce problème ; nous avons reconnu la justesse de leur conception. Ils avaient signalé l'influence des êtres vivants plus spécialement celle des microbes réducteurs ; développant ce point de vue nous avons montré que l'action des microbes oxydants ne devait pas être négligée, leur action n'est peut-être pas essentielle mais certainement adjuvante.

En outre, nous avons montré à plusieurs reprises que dans une enceinte fermée en présence d'air après une phase de dégénération presque totale apparaissait un processus de régénération des principes réducteurs des eaux sulfureuses ; nous pensons que seule une explication biologique permet de rendre compte de ce phénomène.

Par cette étude et par la publication de la note à l'Académie de Médecine à laquelle nous avons collaboré, nous espérons avoir attiré, une fois de plus, l'attention des chercheurs sur l'importance de la vie dans les eaux minérales ; par des méthodes analogues on pourra peut-être étudier avec profit la biologie des eaux ferrugineuses et son influence sur la conservation de ces eaux.

Dans nos travaux les recherches théoriques et les réalisations industrielles ont marché de pair.

La fabrication d'ampoules d'eau d'Uriage remplies sous azote dans des conditions excluant le contact de l'eau minérale avec l'air au cours du remplissage, nous a permis d'assurer l'intégrité physico-chimique de l'eau conservée en ampoules et de mettre en évidence d'intéressantes relations entre les conditions physico-

chimiques et l'évolution des être vivants existant dans notre eau sulfureuse. Enfin, d'après les premières constatations des Cliniciens, cités plus haut, les injections intra-tissulaires d'eau d'Uriage dont l'action thérapeutique est incontestable, doit pouvoir se généraliser et c'est notre devoir de remercier ceux qui nous ont fait confiance et qui nous ont aidé matériellement à atteindre ce résultat intéressant.

— FIN —

Vu et approuvé,
le Président de la thèse :
F. RIMATTEI.

Vu et approuvé,
le Doyen :
L. CORNIL.

Vu et permis d'imprimer,
Aix, le 24 mai 1950,

le Recteur :
M. BLACHE.

Bibliographie

OUVRAGES GENERAUX :

- A.-R. PREVOT : Les Barégimes.
Congrès International du Soufre Cauteret 13-14-15 sept. 1948.
- M. WEINBERG, R. NATIVELLE, A.-R. PREVOT : Les microbes anaérobies Monographies de l'Institut Pasteur, Masson 1937. Pages 858 à 867.
- Mêmes Auteurs* : Manuel de Classification et de détermination des Bactéries Anaérobies. Monographies de l'Institut Pasteur, Masson 1948.
- L. LERICHE ET ABBADIE TOURNIE : Les Sulfobactéries leur rôle dans les Eaux Sulfureuses. Congrès International d'Hydrologie et de Climatologie 6^{me} session, Grenoble 1902. Page 356.
- LEON MORET : Les Sources Thermales. Masson 1946.
- M. HUYBRECHT : Le PH et sa Mesure, Les Potentiels d'Oxydo-Réduction, le Rh. Masson 1947.
- F. TOUPLAIN : Analyse Générale des Eaux. Librairie Polytechnique. Ch. Béranger 1922.
- A. GORIS ET A. LIOT : Pharmacie Galénique. Masson 1939.

OUVRAGES SPECIAUX :

- (1) LOEPER : Le Soufre. Masson 1943.
- (2) LARAT : Bulletin de l'Académie de Médecine. Séance du 14 avril 1925. Tome XLIII N° 15.
- (3) QUINTON : L'Eau de Mer milieu organique. Masson 1908.
- (4) F. RIMATTEI ET J. PETIT : A propos de l'évolution de l'Eau des Camoins-les-Bains. Annales de l'Institut d'Hydrologie et de Climatologie 1938, 12, Fasc. 2, n° 44.
- (4^{bis}) J. PETIT : Contribution à l'étude des variations des propriétés des Eaux Sulfureuses. Thèse Doct. Université Pharmacie, Marseille, 1938.
- (5) CAUJOLLE : Sur le Ph et l'Alcalinité Potentielle. Annales du Laboratoire d'Aix-les-Thermes, n° 1, 1935.
- (6) PECH : L'indice de Nutrition des Eaux Minérales étudié sur les eaux en bouteilles et au Griffon, (Bulletin Soc. Encour. p. Ind. Nat., Juillet 1933, page 401).

- (7) LONGCHAMP : Note sur les Eaux Sulfureuses de Barèges, Caunterêt, Saint-Sauveur. Ann. de Chimie et Physique Tome XXII 1833.
- (8) CERTES ET GARRIGOU : De la présence constante de micro-organismes dans les Eaux de Luchon recueillies au griffon à la température de 66° et de leur action sur la production de la barégine - Congrès Intern. d'Hydr., Derm., et Géo. Biarritz 1886.
- (10) S. WINOGRADSKY : « Contribution à la morphologie et à la physiologie des Sulfobactéries ». Œuvres complètes, Paris 1949, Masson et Cie p. 89.
- (11) BUTSCHLI : Ueber den bau der Bakterien und verwandter organismen - Vostrag Leipzig 1890. (D'après Trabaud).
- (12) W. BENECKE : Bau und Leben der Bakterien - Leipzig Teubner 1912. (D'après Trabaud).
- (13) E. TRABAUD : Sulfobactéries et Barégines - Thèse doc. Pharm. Montpellier, novembre 1928.
- (14) S. WINOGRADSKY : Beitrage zur Morphologie und Physiologie der Bakterien I Schwefelbakterien, Leipzig 1888 (1 - 120).
- (15) NATHANSON : Uber eine neue Gruppe von farblosen Schwefelbakterien und ihrem stoffuecsel - Mit. Zool. Station, Neapel 1903, 15 - 655.
- (16) BEIJERINCK M. W. : Uber die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit kohlensäure als Kolhenstoffquelle ernähren können - Centralbl. F. Bakt., 2 Abt. 11, 593-599.
- (17) SELMAN A. WAKSMAN : Microorganism concerned in the oxidation of sulfur in the soil - Journal of Bacteriology Vol. VII N° 2 März 1922, 239-256.
- (18) TH. ANDREI : Contribution à l'étude des Eaux Sulfureuses. Thèse doct., Univers., Pharm. Marseille 1940.
- (18^{bis}) F. RIMATTEI ET TH. ANDREI : Dosage de l'Hydrogène sulfuré et des sulfures dans les eaux minérales. (Soc. Hydr. Paris Pâques 1945).
- (19) DUPASQUIER : Nouvelles méthodes d'analyse des Eaux Sulfureuses ; l'Iode réactif de l'acide Sulfhydrique. Sulfhydrométrie - Ann. de Chim. t. 73, 1840, pages 310-315.
- (20) F. RIMATTEI ; Analyse électrique de l'évolution d'une eau chlorosulfureuse, Presse Thermale et Climatologique (sous presse)
- (21) F. RIMATTEI, J. PASTOR ET J. HERVE : Sur l'évolution d'une eau sulfureuse alpine conservée en ampoules scellées à la lampe. Communication à l'Académie de Médecine (17 mai 1949).
- (22) P. URBAIN : Analyse des Eaux minérales de quelques stations des Alpes Françaises ; Ann. de l'Inst. d'Hydrologie et de Climatologie, Tome VII, Fascicule I.

Table des Matières

INTRODUCTION	9
I. ETUDE THEORIQUE	15
Travaux antérieurs relatifs à l'évolution des eaux sulfureuses conservées en ampoules scellées à la lampe (Travaux de MM. RIMATTEI et PETIT)	
A) Définition et rappel succinct de la méthode de mesure des grandeurs suivantes : sulfuration alcalinité, conductivité électrique, pH et pouvoir tampon, indice de nutrition	15
B) Résultats obtenus concernant les variations en fonction du temps de ces grandeurs sous l'influence des agents physiques et chimiques : air renfermé dans l'ampoule, chaleur, lumière, pH, présence de Barégine	18
Etude théorique de la biologie des eaux sulfureuses	20
A) Généralités	20
B) Etude bactériologique spéciale de l'eau d'Uriage	22
a) Recherche des anaérobies réducteurs de sulfates	22
b) Recherche des autotrophes oxydants	24
C) Bactériologie générale de l'Eau d'Uriage	36
Conclusions	40
II. ETUDE EXPERIMENTALE	41
1°) Rappel des grandeurs intervenant dans le repérage physico-chimique	41
2°) Résultats obtenus	49
A) Mesures chimiques personnelles faites à Uriage	49
B) Autres observations faites à Uriage	52
C) Mesures faites au Laboratoire d'hydrologie de la Faculté de Marseille,	53
3°) Conclusion	57
III. APPLICATION DES RESULTATS DE L'ETUDE THEORIQUE ET EXPERIMENTALE	58
IV. CONCLUSION GENERALE	69
Bibliographie	71

